

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Samuel Heller

ALDOSTERON SYNTÁZA U ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE A MOŽNÝ
VLIV POLYMORFISMU JEJÍHO GENU NA HYPERTROFII LEVÉ
KOMORY SRDEČNÍ

Aldosterone synthase in arterial hypertension and possible influence of
its genetic polymorphism on left ventricular hypertrophy

Disertační práce

MUDr. Samuel Heller

Školitel: Prof. MUDr. Karel Horký, DrSc.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 6. 2013

MUDr. Samuel Heller

Identifikační záznam:

HELLER, Samuel. Aldosteron syntáza u arteriální hypertenze a možný vliv polymorfismu jejího genu na hypertrofii levé komory srdeční. [*Aldosterone synthase in arterial hypertension and possible influence of its genetic polymorphism on left ventricular hypertrophy*]. Praha, 2013, 90 stran. Přílohu práce tvoří 4 samostatné publikace otisknuté v časopisech s definovaným IF. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, II. Interní klinika kardiologie a angiologie VFN a 1. LF UK, Vedoucí práce: Prof. MUDr. Karel Horký, DrSc.

Obsah

Aldosteron syntáza u arteriální hypertenze a možný vliv polymorfismu jejího genu na hypertrofii levé komory srdeční.....	1
Poděkování.....	8
Souhrn	10
Abstract	12
Klíčová slova	14
Key Words	14
Část 1. Aldosteron syntáza, polymorfismus jejího genu a možný vliv na hypertrofii levé komory srdeční a krevní tlak	15
Úvod.....	15
Arteriální hypertenze jako jeden z hlavních faktorů vzniku aterosklerózy	15
Genetika a hypertenze.....	16
Vliv genetiky na distální a intermediární fenotyp	17
Neurohumorální vlivy	18
Sympatický nervový systém a krevní tlak	18
Systém renin angiotensin aldosteron (RAAS).....	20
Působení aldosteronu	22
Genomický efekt	22
Mineralokortikoidní receptor.....	23
Negenomický efekt.....	24
Srovnání esenciální hypertenze s primárním hyperaldosteronismem.....	25
Aldosteron a postižení ledvin	25
Aldosteron a metabolický syndrom	26
Aldosteron a rezistentní hypertenze	27
Aldosteron a remodelace myokardu	28
Blokáda RAAS za patologických stavů	28
Klinické použití farmakologické blokády mineralokortikoidního receptoru (MR) pro aldosteron	30
Vliv RAAS a aldosteronu na elektrickou aktivitu myokardu	31
Lokální systém RAAS	32
Biosyntéza aldosteronu, regulace tvorby aldosteronu a aldosteron syntáza - CYP11B2 ...	34
Syntéza aldosteronu.....	34
Regulace syntézy aldosteronu.....	35
CYP11B2 - gen pro aldosteron syntázu.....	36
Inhibitory aldosteron syntázy	37
Hypertrofie myokardu.....	38

Typy hypertrofie myokardu a diagnostika	38
Mechanismy působící hypertrofii myokardu	39
Hodnocení hypertrofie pomocí zobrazovacích metod.....	41
Polymorfismus aldosteron syntázy T-344C a vztah k hypertenzi a hypertrofii myokardu...	42
CYP11B2 a hypertenze	42
CYP11B2 a hypertrofie srdeční	43
Hypotéza	44
Cíle práce.....	44
Metody	45
Studované populační soubory	45
Metodika stanovení polymorfismu aldosteron syntázy.	45
Stanovování hormonálních hladin.....	47
Echokardiografie	48
Statistické hodnocení	49
Výsledky	50
Výsledky souboru mladých normotenzních mužů	50
Populace	50
Humorální parametry	51
Struktura levé komory a funkce	51
Vyšší renin, genotyp TT a index hmotnosti LK	51
Výsledky souboru hypertoniků ve srovnání s hypertoniky rezistentními na léčbu a zdravými kontrolami – souvislost s genotypem CYP11B2	53
Diskuse.....	55
Asociační studie a kvalita souboru.....	55
TT genotyp a plasmatická hladina aldosteronu	55
TT genotyp a vyšší index hmotnosti levé komory.....	56
Vyšší plasmatická reninová aktivita a genotyp TT.....	57
TT genotyp a arteriální hypertenze	57
CYP11B2 u primárního aldosteronismu.....	58
Limitace transversální studie	59
Shrnutí diskuse	60
Závěr.....	61
Část 2. Subklinické změny u arteriální hypertenze na úrovni cévní stěny a formovaných elementů	62
Cirkulující cytoadhesivní molekuly a markery endoteliální dysfunkce u nekomplikované arteriální hypertenze a efekt léčby inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu.	62
Hemodynamické síly působící na endotel	62

Endoteliální dysfunkce jako časný marker postižení cév	63
Základní typy cytoadhesivních molekul.....	64
Hormonální faktory ovlivňující funkci endotelu.....	66
Hypotéza	71
Cíl práce	71
Metody.....	72
Studovaná populace.....	72
Laboratorní metody:	73
Výsledky	74
Diskuse.....	77
Závěr.....	79
Seznam zkratek	80
Literatura	82
Přílohy	91

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval mnoha skvělým lidem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Především svému školiteli Prof. MUDr. Karlovi Horkému, DrSc., dnes již bývalému přednostovi II. interní kliniky VFN a 1. LF UK, který vedl laboratoř molekulární kardiologie, ve které se veškerá laboratorní práce odehrála. Bylo to především díky jeho moudrosti a laskavému a podnětnému vedení, že v laboratoři vzniklo tolik prací týkajících se kandidátních genů, zvláště v oblasti systému renin angiotensin a aldosteron, na jejichž části jsem se mohl podílet. Za jeho trpělivost, pochopení a trvalou podporu a profesionální rozvoj nemohu dostatečně poděkovat.

Děkuji velice Prof. MUDr. Alešovi Linhartovi, DrSc., přednostovi II. interní kliniky VFN a 1.LFUK, za jeho velkou část práce týkající se provádění echokardiografických měření, výuku vaskulární sonografie a pomoc při hodnocení výsledků a přípravě článku do tisku i povšechné jiné odborné vedení a trvalou profesionální podporu ve všech oblastech.

Velké díky patří RNDr. Marii Jáchymové a RNDr. Antonínu Jindrovi, kteří mi byli nápomocni od začátků laboratorní práce po interpretaci výsledků. Jejich přátelství a pomoci si velice vážím.

Velké díky patří MUDr. Zuzaně Hlubocké PhD., která odvedla největší kus práce při výzkumu cytoadhesivních molekul.

Děkuji laborantkám Ludmile Pourové, Ireně Medové a Hance Řehákové za jejich pomoc při zpracování genetického materiálu.

Děkuji také MUDr. Věře Umnerové, která věnovala svůj čas a energii studii s cytoadhesivními molekulami. Z její ambulance se rekrutovala velká část rezistentních hypertoniků pro studium polymorfismu aldosteron syntázy ve vztahu k hypertenzi.

Také děkuji MUDr. Janu Peleškovi za vstřícnost a klinickou práci se soubory hypertenzních pacientů.

Můj dík patří také MUDr. Danielovi Ellederovi za pomoc se sestavením primerů pro aldosteron syntázu a inspiraci v začátcích laboratorní práce.

Rád bych také na tomto místě poděkoval Prof. MUDr. Michaelovi Aschermannovi DrSc., bývalému přednostovi a primáři kliniky MUDr. Vratislavovi Mrázkovi CSc., MBA za praktickou podporu při současné klinické a výzkumné práci a za umožnění poznat a osvojit si problematiku kardiologie a angiologie v celé šíři a profesionální rozvoj na poli klinické medicíny.

Rád bych velmi poděkoval všem kolegům, kteří mi umožnili tuto práci dokončit, a paní Pavle Kadlecové ze studijního oddělení za ochotu při řešení finalizace práce.

Nakonec bych rád velmi poděkoval své rodině za tak potřebnou podporu a pochopení.

Tato práce a výsledky v ní prezentované vznikly za podpory grantů IGA MZ NA/5615-3 a NA/7171-3 a KP 204/98/K015.

SOUHRN

Práce má dvě části. První část byla prováděna v rámci širšího výzkumu kandidátních genů v etiologii arteriální hypertenze zvláště v systému renin angiotensin aldosteron se zaměřením na aldosteron syntázu a vliv jejího polymorfismu na krevní tlak, humorální parametry a srdeční hypertrofii.

Druhá část se zabývá hodnocením preklinických stadií aterosklerózy u hypertoniků, kteří neměli žádná jiná rizika vzniku aterosklerózy kromě hypertenze. Hodnotili jsme endoteliální dysfunkci a hladiny cytoadhesivních molekul jako markerů časného poškození cévní stěny u pacientů a jejich reakci na léčbu.

Důvodem dvou témat byla změna laboratorních metod na klinice a společným jmenovatelem byl systém renin angiotensin aldosteron a výzkum hypertenze a rozvoje aterosklerózy v iniciálních stádiích jako dvou nejrozšířenějších kardiovaskulárních chorob.

Část I. Polymorfismus aldosteron syntázy (CYP11B2) -344 T/C ve vztahu k arteriální hypertenzi a hypertrofii levé komory srdeční

Úvod: Aldosteron je klíčovým efektem systému renin angiotensin aldosteron RAAS. Je syntetizován v nadledvinách v zona glomerulosa a váže se na specifické mineralokortikoidní receptory v epitelálních tkáních – v distálním tubulu ledvin a v colon, kde reguluje hospodaření se sodíkem a vodou. Aldosteron má efekt i na kardiovaskulární aparát, mineralokortikoidní receptor byl popsán v kardiomyocytech, fibroblastech, buňkách hladkých svalů stěny cévní a v monocytech – makrofázích. Byla také popsána lokální produkce aldosteronu v myokardu i cévní stěně. Nadprodukce aldosteronu vede k hypertrofii myokardu, perivaskulárnímu zánětu a k fibróze myokardu. Aldosteron také zvyšuje aktivitu sympatického systému tím, že snižuje zpětné vychytávání noradrenalinu na nervových zakončeních. V rozsáhlých randomizovaných studiích u pacientů se srdečním selháním přidání inhibitorů mineralokortikoidních receptorů k optimální léčbě srdečního selhání výrazně snižovalo mortalitu. Inhibice systému renin angiotensin aldosteron vede k zlepšení endoteliální funkce a regresi hypertrofie a fibrotizace myokardu. Enzymem, který určuje rychlost syntézy aldosteronu je aldosteron syntáza CYP11B2. V oblasti jejího promotoru, kam se váže steroidogenní faktor -1, byl popsán polymorfismus T/C.

Design a metody: Zjišťovali jsme, zda tento polymorfismus může ovlivnit hmotnost levé komory a humorální parametry, zvláště plasmatické hladiny reninu a aldosteronu na velmi konzistentním souboru mladých zdravých mužů $n=113$. Dále jsme zjišťovali vztah genotypu T-344C CYP11B2 k arteriální hypertenzi na souboru, léčených hypertoniků $n=139$ s kontrolovanou hypertenzí, pacientů s rezistentní hypertenzí $n=74$ a zdravých kontrol středního věku $n=156$. Genotyp jsme stanovovali metodou RFLP (restriction fragment length polymorphism). Kardiální parametry byly hodnoceny echokardiograficky.

Výsledky: U mladých zdravých dobrovolníků jsme zjistili signifikantně vyšší hodnoty plasmatické reninové aktivity u nositelů alely TT (2.7 ± 1.7 vs 1.8 ± 1.0 vs 1.8 ± 1.1 ng/ml/h, $p < 0.01$, hodnoty pro TT, TC, CC). Poté, co jsme rozdělili probandy podle mediánu plasmatické reninové aktivity na ty s nízkým a vyšším reninem, jsme zjistili, že držitelé genotypu TT v přítomnosti vyšší reninové aktivity mají statisticky významně vyšší index hmotnosti levé komory (95 ± 17 vs 84 ± 16 vs 81 ± 15 g/m², $p < 0.05$ hodnoty pro TT, TC, CC).

U pacientů s arteriální hypertenzí jsme demonstrovali signifikantní rozdíl v četnosti alel oproti zdravým kontrolám. Genotyp CC se vyskytuje častěji u normotenzních kontrol $p < 0,01$, zatímco alela T se vyskytuje častěji u pacientů s arteriální hypertenzí $p < 0,05$.

Závěr: Genotyp TT -344 T/C polymorfismu aldosteron syntázy (CYP11B2) je asociován s arteriální hypertenzí a hypertrofií levé komory srdeční.

Část II. Endoteliální dysfunkce u nekomplikované arteriální hypertenze a vliv léčby inhibitory ACE

Úvod: Endotel je prakticky všeprostupujícím orgánem v lidském těle a jeho poškození vede k vaskulárnímu postižení s následnými změnami cílových orgánů. Rizikové faktory aterosklerózy jako kouření, hypertenze, dyslipidemie a hyperglykémie způsobují dysfunkci endotelu. U pacientů s arteriální hypertenzí je endoteliální dysfunkce charakterizována poruchou na endotelu závislé vazorelaxace, zvýšenou adhezivitou a permeabilitou endoteliálních buněk. Při poškození endotelu dochází k expresi cytoadhesivních molekul a cytokinů a následné migraci zánětlivých buněk do cévní stěny. Cytoadhesivní buňky jsou z povrchu endotelií odlučovány do krevního toku, kde mohou sloužit, jako marker dysfunkce endotelu.

Design a metody: Zjišťovali jsme pomocí laboratorních markerů stupeň endoteliální dysfunkce u hypertoniků $n=22$ bez jakýchkoli projevů orgánového postižení a bez dalších aterogenních faktorů oproti zdravým kontrolním jedincům $n=22$. Sledovali jsme hladiny cirkulujících adhesivních molekul, von Willebrandova faktoru (vWf), endothelinu a koagulačních parametrů.

Pak jsme zjišťovali, zda 3 měsíční léčba inhibitory ACE (po předchozím vysazení antihypertenzní léčby na 3 týdny) povede ke zlepšení endoteliální funkce a k poklesu hladin cirkulujících cytoadhesivních molekul v plasmě.

Výsledky: Potvrdili jsme známky endoteliální dysfunkce u nekomplikované esenciální arteriální hypertenze, ještě bez projevů orgánového postižení, s vyššími hladinami ICAM-1 (238 vs 208 ng/ml, $P = 0.02$), vWf (119 vs 105 IU/dl, $P < 0.05$) a endothelinu-1 (5.76 vs 5.14 fmol/ml, $P < 0.05$), ve srovnání se zdravými kontrolami. Po léčbě inhibitory ACE došlo k významnému poklesu plasmatického endothelinu-1 (5.76 vs 5.28 fmol/ml, $P < 0.01$). V ostatních parametrech jsme zaznamenali příznivý trend bez statistické významnosti.

Závěr: Systém renin angiotensin aldosteron je klíčovým mechanismem podílejícím se na endoteliální dysfunkci již časných stádiích nekomplikované hypertenze bez orgánových postižení. Blokáda systému renin angiotensin aldosteron je příznivá již na počátku onemocnění než dojde k poškození cévní stěny a orgánovým komplikacím.

ABSTRACT

Part I. The aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphism T-344C in blood pressure and left ventricular hypertrophy.

BACKGROUND: Aldosterone is a key cardiovascular hormone, it significantly influences volume, pressure and electrolyte balance. Aldosterone plays an important role in development of left ventricular (LV) hypertrophy and myocardial fibrosis. The aldosterone synthase gene (CYP11B2) is an important candidate gene region in essential hypertension.

DESIGN AND METHODS: We assessed the influence of the T-344C polymorphism of aldosterone synthase - the rate-limiting enzyme in aldosterone biosynthesis - on the structure of the left ventricle in young normotensive men. The population included 113 normotensive mid-European Caucasian men aged 18-40 years (mean 27 +/- 5 years).

We also studied the association of -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene with the presence and severity of hypertension in 369 individuals, of whom 213 were hypertensive patients (139 controlled hypertensive, 74 resistant hypertensive) and 156 were healthy normotensive subjects.

The genotype was assessed using polymerase chain reaction with subsequent cleavage with restriction enzyme HaeIII (restriction fragment length polymorphism method) and visualization with ethidium bromide. Plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone were measured by conventional RIA using Immunotech kits. LV mass was assessed by echocardiography by using M-mode based ASE formula.

RESULTS: In the population of normotensive young men the distribution of the genotypes was TT 23%:TC 55%:CC 22%. There were no differences in blood pressure among the groups. Men with the TT genotype had significantly higher levels of PRA (2.7 ± 1.7 vs 1.8 ± 1.0 vs 1.8 ± 1.1 ng/ml/h, $p < 0.01$) and slightly higher plasma levels of aldosterone (113 ± 64 vs 93 ± 43 vs 87 ± 39 pg/ml, $p = 0.12$). In the whole population, LV mass index (LVMI) did not differ significantly among the genotypes (92 ± 16 vs 86 ± 18 vs 84 ± 16 g/m², $p = 0.20$). In the population divided according to PRA, subjects with high renin had significantly higher LVMI in presence of the TT genotype (95 ± 17 vs 84 ± 16 vs 81 ± 15 g/m², $p < 0.05$).

The distribution of genotypes in normotensive controls and hypertensive subjects were: TT 25.6 vs. 31.9 %, TC 51.9 vs. 57.3 % and CC 22.4 vs. 10.8 %. The -344T/C variant was associated with hypertension. Subjects carrying the -344T allele had a greater risk of hypertension compared to those having C allele ($\chi^2 = 5.89$, $p < 0.05$). The frequency of CC genotype was significantly lower in hypertensive patients than in normotensive controls ($\chi^2 = 9.44$, $p < 0.01$). A stepwise logistic regression analysis confirmed these findings.

CONCLUSIONS: We found that the TT genotype of T-344C polymorphism of aldosterone synthase gene was associated with significantly higher levels of PRA in normotensive men. In subjects with high PRA, the TT genotype was associated with higher values of the LVMI.

We did not find any association of -344T/C variant with the resistance of hypertensive patients to combination therapy, but we observed an association of -344T/C polymorphism of aldosterone synthase gene with increased risk of hypertension. These results support a potential role of -344T/C CYP11B2 gene polymorphism in genetic predisposition to develop hypertension.

Part II. : Circulating cell adhesion molecules and markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension and the effect of treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors

BACKGROUND: The endothelium lines all blood vessels in the human body, its impaired function is a basic factor in the genesis and development of vascular disease. Risk factors of cardiovascular diseases such as hypertension, hyperlipidaemia, hyperglycaemia, smoking damage the function of endothelial cells and cause the development of endothelial dysfunction. In patients with arterial hypertension endothelial dysfunction is characterized by an impaired endothelium dependent relaxation, increased adhesion and permeability of endothelial cells, structural changes of the vascular wall. When the endothelium is damaged by released cytokines an increased expression of adhesion molecules occurs, adhesion and migration of inflammatory cells across the vascular wall. Cytoadhesion molecules are released from the surface of the endothelium into the circulation where the rise of their plasma levels can serve as a marker of endothelial damage. Endothelial dysfunction in hypertensive subjects contributes way to the development and progression atherosclerosis. Improvement of the damaged endothelial function is therefore at present a desirable therapeutic objective in the treatment of hypertension.

DESIGN AND METHODS: The aim of our study was to examine whether the circulating cell adhesion molecules, von Willebrand factor (vWf) and endothelin-1, are elevated in patients with essential hypertension with no other risk factors for atherosclerosis and thus may serve as a markers of endothelial dysfunction in uncomplicated hypertension. We also studied the effect of treatment with the ACE inhibitor, quinapril, on levels of endothelial dysfunction markers.

The levels of adhesion molecules (intercellular cell adhesion molecule-1 [ICAM-1], E-selectin, P-selectin), von Willebrand factor (vWf) and endothelin-1 were measured in patients with hypertension without any other risk factors of atherosclerosis before (after a 3 weeks washout period from previous antihypertensive treatment) and after treatment with quinapril (n = 22) and in normotensive controls (n = 22).

RESULTS: Compared with normotensive subjects, the hypertensive patients had significantly higher levels of ICAM-1 (238 vs 208 ng/ml, $P = 0.02$), vWf (119 vs 105 IU/dl, $P < 0.05$) and endothelin-1 (5.76 vs 5.14 fmol/ml, $P < 0.05$). Three-month treatment of hypertensive patients with quinapril led to a significant decrease in the levels of endothelin-1 (5.76 vs 5.28 fmol/ml, $P < 0.01$). We did not observe significant changes in the levels of adhesion molecules and vWf after ACE inhibitor treatment, although a trend toward a decrease was apparent with all these parameters.

CONCLUSIONS: Patients with uncomplicated hypertension with no other risk factors of atherosclerosis had significantly elevated levels of ICAM-1, vWf, and endothelin-1. Our data suggest that these factors may serve as markers of endothelial damage even in uncomplicated hypertension. In hypertensive patients, treatment with the ACE inhibitor quinapril resulted in a significant decrease in endothelin-1 levels. These findings indicate a beneficial effect of ACE inhibitors on endothelial dysfunction in hypertensive patients.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aldosteron, aldosteron syntáza, CYP11B2, polymorfismus genu, systém renin angiotensin aldosteron, mineralokortikoidní receptor, arteriální hypertenze, hypertrofie levé komory, RFLP, polymorfismus restrikčních fragmentů

Endoteliální dysfunkce, cytoadhesivní molekuly, ICAM-1, von Willebrandův faktor, endotelin, E-selektin, angiotensin konvertující enzym, inhibitor ACE, quinapril

KEY WORDS

Aldosterone, aldosterone synthase, CYP11B2, gene polymorphism, renin angiotensin aldosterone systém, mineralocorticoid receptor, arterial hypertension, left ventricular hypertrophy, RFLP, restriction fragment length polymorphism

Endothelial dysfunction, cytoadhesive molecules, ICAM-1, von Willebrand factor, endotelin, E-selectin, angiotensin converting enzyme, ACE inhibitor, quinapril.

ČÁST 1. ALDOSTERON SYNTÁZA, POLYMORFISMUS JEJÍHO GENU A MOŽNÝ VLIV NA HYPERTROFII LEVÉ KOMORY SRDEČNÍ A KREVŇÍ TLAK

ÚVOD

ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE JAKO JEDEN Z HLAVNÍCH FAKTORŮ VZNIKU ATEROSKLERÓZY

Arteriální hypertenze působí dlouho a skrytě bez zjevných změn a orgánových postižení. Ve svých konečných důsledcích vede k aterosklerotickým změnám s komplikacemi s různým orgánovým postižením a stává se tak jednou z hlavních příčin morbidity a mortality v rozvinutých zemích.

Období subklinického postižení u arteriální hypertenze je důležité pro prevenci progresu onemocnění, jako např. infarktu myokardu nebo mozkové cévní příhody, a možný včasný terapeutický zásah.

Proto vznikla potřeba stanovení markerů, které by mohly stratifikovat pacienty a lépe určit zvýšené riziko progresu onemocnění.

Vedle dalších běžných známých rizikových faktorů pro vznik aterosklerózy jako je kouření, diabetes mellitus, a dyslipidemie byly zkoumány i další patofyziologické procesy a vlivy ¹, které hrají roli v přechodu od benigní hypertenze v hypertenzi s pokročilými orgánovými změnami jako např. hypertrofií srdeční ^{2, 3}. Ty zahrnují kromě jiného změny genetické např. v oblasti hormonů ovlivňujících kardiovaskulární systém a molekulární změny na úrovni endotelu v iniciálních stádiích migrace zánětlivých buněk do subendoteliálních prostorů ještě před vznikem aterosklerotického plátu ⁴.

GENETIKA A HYPERTENZE

V etiopatogenezi arteriální hypertenze hraje kromě environmentálních faktorů také roli genetika. Na počátku devadesátých let byly identifikovány některé geny zodpovědné za výskyt těžké familiárně vázané arteriální hypertenze.

Prvním detailně popsaným příkladem autozomálně dominantně podmíněné hypertenze je glukokortikoidy supresibilní hyperaldosteronismus (familiární hyperaldosteronismus typu I). Jedná se o genetickou poruchu, kdy dva geny 11 β hydroxyláza a aldosteron syntáza, které jsou za normálních okolností na stejném chromozomu vzdáleny od sebe dostatečně daleko a řízeny nezávislými mechanismy, se dostanou přímo za sebe a vznikne tzv. chimerický gen, který má regulační část z 11 β -hydroxylázy, která normálně tvoří kortizol a je řízena ACTH (kortikotropinem), kódující část je však z aldosteron syntázy. Tento změněný gen je exprimován v zona fasciculata kůry nadledvin, kde normálně probíhá syntéza kortizolu, a tak dochází k nadměrné tvorbě aldosteron syntázy, která tvoří nadměrné množství aldosteronu. Její exprese je však řízena ACTH z hypofýzy⁵. Podávání kortikoidů zablokuje zpětnou vazbu sekreci ACTH a vede k snížení sekrece aldosteronu a ke snížení krevního tlaku.

Další geneticky vázanou poruchou je Liddleův syndrom, který byl popsán v šedesátých letech jako forma nízkoreninové těžké hypertenze a později byla dekodována jeho molekulárně genetická podstata. Jeho podkladem jsou různé mutace beta a gama podjednotek amilorid senzitivního epitheliálního sodíkového kanálu ENaC, které vedou k jeho konstitutivní aktivaci, jejímž následkem je výrazná retence sodíku, která vede k hypertenzi. Exprese a aktivace ENaC je mimo jiné jedním z finálních efektů systému renin angiotensin aldosteron⁶.

Na příkladu monogenních forem těžké hypertenze je patrné, že pro jejich etiopatogenezu, nebo můžeme-li abstrahovat pro etiopatogenezu těžké hypertenze vůbec, je pravděpodobně klíčové hospodaření se sodíkem a vodou.

Esenciální hypertenze je polygenní onemocnění, kdy známe mnoho možných mechanismů, které mohou vést k hypertenzi. U hypertenzních jedinců může docházet k nakupení jednotlivých prohypertenčních genetických změn. Neznáme však přesně základní příčinu na rozdíl od geneticky podmíněných hypertenzí.

VLIV GENETIKY NA DISTÁLNÍ A INTERMEDIÁRNÍ FENOTYP

S rozmachem molekulárně genetických metod se kromě studia Mendelovsky vázaných těžkých hypertenzí přistoupilo ke studiu genů, které se na regulaci krevního tlaku bezpochyby podílí – tzv. kandidátních genů. Tedy genů kódujících klíčové působky, receptory a iontové kanály, které regulují napětí cévní stěny a hospodaření se sodíkem a vodou. Tyto geny a dopad jejich působení lze zkoumat u lidí např. hypertoniků s rodinným výskytem hypertenze.

Je obtížné najít přímý vztah určitého genu přímo ke krevnímu tlaku. V kaskádě je příliš mnoho proměnných. Pravděpodobnější je definovat určitý intermediární fenotyp tj. např. hypertoniky s vysokou plasmatickou reninovou aktivitou nebo s jiným charakteristickým měřitelným patofyziologickým parametrem a hledat poruchu v genech, které tento fenotyp ovlivňují, což může výrazně zúžit a zjednodušit hledání.

Jinou formou studia podílu genetiky na hypertenzi jsou pokusy na zvířatech, kdy jsou zkoumány speciálně vyšlechtěné druhy hypertenzních savců s podobným genomem jako u lidí. Příkladem může být spontánně hypertenzní krysa (SHR). Zde se postupuje jiným způsobem, kdy se mapuje genom např. pomocí mikrosatelitních markerů, na kterém chromozomu je umístěn gen, který má vztah k hypertenzi, a současně se stanovují intermediární fenotypy jednotlivých zvířat, které mohou upřesnit, který konkrétní patofyziologický mechanismus je za hypertenzi zodpovědný⁷.

NEUROHUMORÁLNÍ VLIVY

SYMPATICKÝ NERVOVÝ SYSTÉM A KREVŇÍ TLAK

Autonomní nervový systém, zvláště sympatikus hraje důležitou roli v regulaci krevního tlaku⁸. Působení sympatického nervového systému není podle posledních výzkumů uniformní, ale orgánově specifické, tzn., že v některých orgánech může být výrazně zvýšená aktivita sympatiku a v jiných relativně méně⁹. Hlavními orgány ve středu zájmu studia sympatiku v souvislosti s arteriální hypertenzí jsou srdce a ledviny. U pacientů se srdečním selháním byla prokázána 50 krát zvýšená sympatická nervová aktivita oproti zdravé populaci⁹ a hladina noradrenalinu těsně korelovala s prognózou pacientů se srdečním selháním¹⁰. Na základě tohoto pozorování byla navržena klinická studie s podáváním betablokátoru pacientům s pokročilým srdečním selháním, která prokázala pokles morbidity a mortality léčbou betablokátozem carvedilolem¹¹. Další následné podobné studie s betablokátozem prakticky potvrdily důležitost blokády sympatiku u chronického srdečního selhání.

U nemocných s esenciální hypertenzí bylo opakovaně prokázáno zvýšení sympatické nervové aktivity v ledvinách¹². Zvýšená sympatická aktivita vede ke kaskádě jevů. Renální vasokonstrikce snižuje průtok ledvinou a glomerulární filtraci. Stimulací juxtaglomerulárních buněk jednak přímo přes β -receptory a snížením filtrace dochází k produkci reninu a tím spuštění celé kaskády systému renin angiotensin aldosteron, která vede k reabsorpci sodíku a vody a dále potencuje hypertenzi. Angiotensin II a aldosteron mají také přímý trofický efekt na cévy a myokard a angiotensin II stimuluje vasomotorické centrum v mozgovém kmeni a byl popsán vliv aldosteronu na sympatickou nervovou aktivitu lokálně v mozku¹³. Ischemie ledviny způsobená různými druhy hypoperfúze vede také k aferentní signalizaci a dalšímu zvýšení sympatické aktivity z CNS směrem k ledvinám, což platí zejména pro konečné stádium selhání ledvin⁸.

V současné době je důkazem zásadního vlivu sympatiku na rozvoj hypertenze a současně praktickou aplikací poznatků získaných v experimentu provedení renální denervace, kdy je většinou ablačním katetrem radiofrekvenční energií přerušena sympatická inervace ledvin. U pacientů dochází po výkonu k poklesu systolického krevního tlaku v průměru o 20-25 mm Hg, jak bylo prokázáno v prvních klinických

studiích Simplicity I a II ¹⁴. Renální denervace, ať již se jedná o různé způsoby provedení, získává značnou popularitu. V současné době probíhají studie, které by měly prokázat efekt na větším množství pacientů s arteriální hypertenzí, s chronickým renálním selháním a srdečním selháním. Zatím je metoda rezervována pro pacienty s rezistentní arteriální hypertenzí v rámci výzkumných projektů.

SYSTÉM RENIN ANGIOTENSIN ALDOSTERON (RAAS)

RAAS – přehled

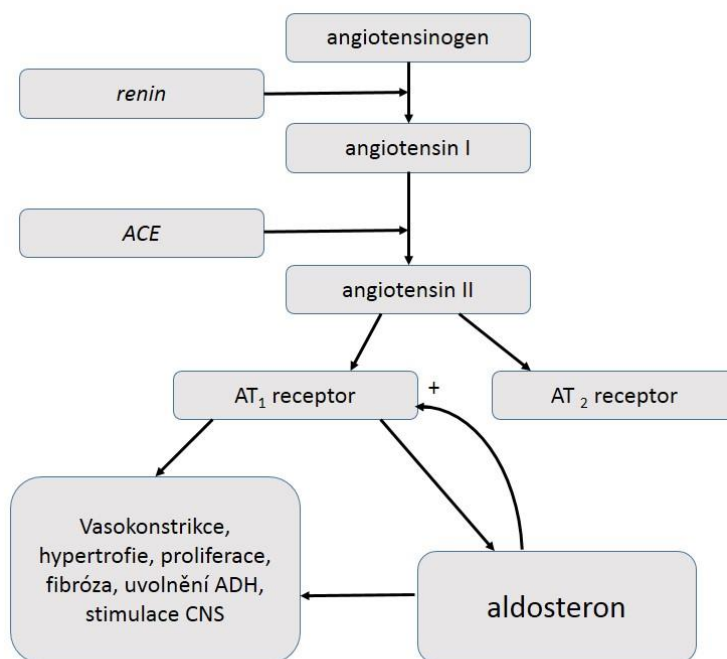
Systém renin angiotensin aldosteron (RAAS) je klíčovým humorálním mechanismem ovlivňujícím fungování kardiovaskulárního aparátu za fyziologických i za patologických situací např. při srdečním selhání. Některé z jeho komponent (viz obr. 1) byly testovány jako kandidátní geny podílející se na vzniku hypertenze a kardiovaskulárních komplikací.

Jeho hlavními efektory jsou angiotensin II a aldosteron. RAAS funguje jednak endokrinně - jako cirkulující RAAS, dále funguje systém RAAS na úrovni tkání jako parakrinní systém a angiotensin byl popsán též intracelulárně jako intrakrinní systém.

Renin je secernován v juxtaglomerulárním aparátu ledvin. Nejprve je jako pro-renin transportován přes membránu ve vezikulách Golgiho aparátu, kde dochází k odštěpení pro-segmentu, a aktivní renin je uvolňován do oběhu. Sekrece reninu je řízena sympatickými nervovými zakončeními především působením na β -adrenergní receptory v juxtaglomerulárním aparátu a může být za patologických stavů modifikována farmakologicky betablokátory¹⁵. Dalším regulátorem sekrece reninu je nálož chloridu sodného na počátku distálního tubulu. Vysoká koncentrace chloridu sodného snižuje sekreci reninu, nízká ji zvyšuje. Renin, proteolytický enzym, pak štěpí angiotensinogen, α -glykoprotein na angiotensin I (deka peptid), který je štěpen angiotensin konvertujícím enzymem (ACE), membránově vázanou metaloproteinázou, která se vyskytuje převážně na endoteliích v plicní cirkulaci, na oktapeptid angiotensin II.

Angiotensin II působí v ledvinách vasokonstrikčně na vas efferens, tím zvyšuje glomerulární tlak a zvyšuje filtraci v ledvinách, současně stimuluje sekreci dalšího efektoru, hormonu aldosteronu převážně v kůře nadledvin, ale i lokálně v cévní stěně, myokardu a v mesangiu v ledvinách.

Aldosteron fyziologicky udržuje homeostázu intravaskulárního objemu regulací vstřebávání sodíku. Primárně se tak děje v ledvinách v oblasti distálního tubulu a v distálním colon. Aldosteron zde zvyšuje resorpci sodíku, který je osmoticky následován vodou, což vede ke zvětšení extra i intravaskulárního objemu.



Obr. 1. Základní schéma kaskády renin - angiotensin – aldosteron, ACE – angiotensin konvertující enzym, ADH – antidiuretický hormon, CNS – centrální nervový systém.

PŮSOBENÍ ALDOSTERONU

GENOMICKÝ EFEKT

Aldosteron cirkuluje v plasmě a není výrazně vázán na plasmatické bílkoviny. Jeho poločas je relativně krátký kolem 20 minut. Je metabolizován převážně v játrech a ve formě tetrahydroglukuronidu nebo 18-glukuronidu je vylučován ledvinami.

Aldosteron má genomický a negenomický účinek ¹⁶. Genomicky působí na mineralokortikoidní receptor (MR) v jádře **epiteliálních buněk** ledvin, tlustého střeva, potních žláz a působí retenci sodíku a exkreci draslíku, čímž hraje důležitou roli v udržování homeostázy soli a vody v organismu. MR je exprimován i v jiných **neepiteliálních tkáních** v kardiovaskulárním systému v kardiomyocytech, endotelu a hladkých svalových buňkách cév a fibroblastech; velmi výrazně je exprimován v centrálním nervovém systému (CNS), zvláště v hippokampu, kde byla po colon zaznamenána největší hustota exprese MR ve tkáni. Dále je exprimován v monocytech a makrofázích, kde zvyšuje expresi matrixmetaloproteinázy-2 a dále je exprimován v adipocytech, kde hraje klíčovou roli v jejich diferenciaci¹⁷.

Aldosteron se váže na intracelulární mineralokortikoidní receptor (MR), přes který pak dochází v jádře ke spuštění syntézy epiteliálního sodíkového kanálu ENaC, Na-H exchangeru-3 (NHE-3), zvyšuje se transport bikarbonátu a aktivita H⁺ ATPázy v proximálních tubulech. Dále byl recentně prokázán pozitivní vliv aldosteronu přes mineralokortikoidní receptor přímo na aktivitu Na⁺ K⁺ ATPázy ¹⁸.

V myokardu byl intracelulární mineralokortikoidní receptor (MR) popsán v kardiomyocytech, endoteliálních buňkách, fibroblastech, buňkách hladkého svalstva cév (i koronárních) a v monocytech a makrofázích. Aktivace MR působí hypertrofii myokardu zvláště v komorách, ukládání vaziva v myokardu (zvláště kolagenu I a III) a perivaskulární fibrózu ¹⁹.

Vazba aldosteronu na MR indukuje disociaci chaperonových proteinů, které udržují receptory neaktivní, tím dojde k expozici nukleárních signálních molekul. MR s navázaným aldosteronem putuje do jádra buňky, kde se váže ke specifickým sekvencím a umožňuje iniciaci transkripce aldosteron responsivních genů jako např. ENaC v ledvinách ²⁰. Cílové geny v myokardu však nejsou zcela přesně zmapovány ²¹.

Je známo několik aldosteronem indukovaných proteinů, které se podílí na jeho fyziologickém působení v cílových tkáních, zvláště v ledvinách.

Sgk1 je serin threonin kináza, která aktivuje iontové kanály - sodíkový kanál ENaC a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPázu a $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ kontraspporter ^{22 23}.

Kirsten Ras GTP binding protein 2A je indukován působením aldosteronu a má vliv na ENaC kanál, který udržuje otevřený a dále má vliv na množství těchto kanálů exprimovaných v plasmatické membráně ^{24 25}.

PI3K (fosfoinositol 3 kináza) je lipidová kináza, která pravděpodobně hraje roli v aktivaci ENaC a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPázy na podněty jednak aldosteronu, ale i vasopresinu a insulinu ²⁶. Gβγ dependentní fosfoinositol 3 kináza (PI3K) je také aktivována při hypertrofii myokardu a hraje roli v reakci velikosti myokardiální buňky v závislosti na tlakovém zatížení.

Recentně byla popsána nová signální cesta při studiu působení aldosteronu na produkci elastinu srdečními fibroblasty, která na rozdíl od produkce kolagenu není zablokovatelná spironolaktonem. Jde tedy o cestu, která není závislá na mineralokortikoidním receptoru. Zahrnuje aktivaci receptoru pro insulin like growth factor- I, který může aktivovat fosfoinositol 3 kinázu PI3K, která je jednou z cest vedoucích k hypertrofii kardiomyocytu ²⁷.

Navíc aldosteron působením přes mineralokortikoidní receptor zvyšuje expresi AT_1 receptoru pro angiotensin II, čímž vytváří systém lokální pozitivní zpětné vazby.

MINERALOKORTIKOIDNÍ RECEPTOR

Mineralokortikoidní receptor (MR) se skládá ze tří domén, centrální vázající DNA (DNA binding domain), která je charakterizována přítomností tzv. zinkových prstů, které umožní zaklesnutí MR do hlavní drážky DNA, kde zprostředkovávají nukleotidově specifický kontakt. Dalšími částmi jsou ligand vázající doména a N terminálová doména, která umožňuje vazbu na další proteiny a receptorem zprostředkovanou transaktivaci.

MR může za fyziologických okolností vázat dva ligandy, aldosteron a kortizol. Běžně se kortizol vyskytuje ve tkáních v koncentracích několiknásobně vyšších než aldosteron.

Za normálních okolností je ve většině buněk, které exprimují mineralokortikoidní receptor, přítomen enzym 11 β dehydrogenáza (11 β HSD-2), která metabolizuje kortizol na neaktivní kortison, a tím umožní vazbu adekvátního ligandu aldosteronu na MR. V patologických situacích za přítomnosti změněného redoxního stavu buňky, zvláště v ledvinách, může snížením aktivity 11 β dehydrogenázy docházet k relativnímu nadbytku kortizolu, který se pak může vázat na mineralokortikoidní receptor MR²⁸. Podle studií prováděných na modelech MR se sekvenční substitucí aminokyselin se jeví, že interakce aldosteronu s MR je do jisté míry rozdílná od interakce MR s kortizolem¹⁷. Navíc kortizol se v suprafyziologických koncentracích váže na glukokortikoidní receptor, který pak antagonizuje MR navozené prozánětlivé změny^{29 17}. Působení kortizolu na MR receptor se jeví jako důležitý a ještě ne zcela zmapovaný mechanismus aktivace MR a jejích následků jak v epiteliálních (ledviny, colon), tak neepiteliálních tkáních (myokard, cévní stěna).

NEGENOMICKÝ EFEKT

Aldosteron má i rychlý negenomický efekt, tzn. spouští přímo a rychle buněčnou odpověď, která není zprostředkována transkripcí DNA. Byla prokázána v různých pokusech např. na perfúzi předloktí, kdy malá dávka aldosteronu podaná intraarteriálně vyvolává okamžitou vazokonstrikci. Tyto efekty předpokládaly přítomnost membránového receptoru³⁰, který byl s největší pravděpodobností recentně identifikován. Byla popsána interakce G protein-coupled estrogenového receptoru (GPER) nebo GPR30, který je exprimován na endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva cév, a aldosteronem v pikomolárních množstvích, který vyvolal buněčnou odpověď, kterou bylo možno zablokovat antagonistou GPR30³¹. K aktivaci GPR30 stačila o několik řádů nižší dávka aldosteronu než estradiolu, po kterém byl původně pojmenován. GPR30 lze minimálně částečně blokovat eplerenonem. GPR30 je tedy s největší pravděpodobností dvacet let hledaným membránovým receptorem pro aldosteron³².

SROVNÁNÍ ESENCIÁLNÍ HYPERTENZE S PRIMÁRNÍM HYPERALDOSTERONISMEM

Z modelu primárního aldosteronismu je známo, že pacienti s arteriální hypertenzí na podkladě zvýšené hladiny aldosteronu vykazují výraznější orgánová postižení než pacienti s esenciální hypertenzí se srovnatelnými hladinami krevního tlaku ³³. Nemocní mají výraznější hypertrofii levé komory srdeční ³⁴, která někdy může mít charakter spíše excentrické hypertrofie, což může být zapříčiněno zvýšením nálože sodíku a vody ³⁵. U nemocných s hyperaldosteronismem byly též popsány pokročilejší cévní změny ^{36 37}. Tyto nálezy svědčí pro to, že aldosteron působí, kromě zvýšení krevního tlaku ovlivněním nálože sodíku a vody, také přímo na hypertrofii levé komory srdeční a vaskulopatii svým trofickým prozánětlivým a fibrotizujícím efektem ³⁸.

ALDOSTERON A POSTIŽENÍ LEDVIN

Vysoké cirkulující hladiny aldosteronu způsobují renální hyperfiltraci a vedou ke glomerulárnímu i tubulárnímu postižení. Aldosteron působí hypertrofii glomerulárního mesangia na zvířecím modelu s následným postižením podocytů, vznikem glomerulosklerózy a proteinurie. Poškození glomerulů je pravděpodobně zprostředkováno zvýšenou aktivitou NADPH oxidázy a akumulací kyslíkových radikálů a lze zvrátit selektivní inhibicí mineralokortikoidních receptorů ³⁹.

Pacienti s chronickým onemocněním ledvin mají i přes zvýšený extracelulární objem často relativně vyšší hladiny aldosteronu. Nacházejí se prakticky ve stavu relativního hyperaldosteronismu. Podobný stav byl popisován i u rezistentní hypertenze a metabolického syndromu ⁴⁰.

Přidání antagonistů MR receptorů k léčbě ACE inhibitory nebo AT₁R blokátory výrazně snižuje proteinurii a albuminurii až o 50%. Efekt je podobný jako při léčbě srdečního selhání. I při adekvátní inhibici některých kroků v kaskádě renin-angiotensin-aldosteron dochází zpětnou vazbou ke zvýšení produkce reninu, který může působit na lokální systémy RAAS. Hladiny aldosteronu se zpočátku po léčbě inhibitory ACE a blokátory AT₁R snižují, s časem postupně opět stoupají k původním hodnotám, dochází k tzv. fenoménu úniku aldosteronu ⁴¹. Na základě recentních

studií u pacientů s diabetickou nefropatií, kdy malá dávka antagonistů MR receptorů, která byla v placebem kontrolovaných studiích podávána místo AT1 blokátorů, vedla k větší redukci proteinurie^{42, 43}, můžeme považovat diabetickou nefropatii za nemoc neadekvátní aktivace mineralokortikoidního receptoru, která může být způsobena buď pouze aldosteronem nebo i aktivací glukokortikoidy za přítomnosti změněného redoxního stavu buňky^{44 28 40}.

ALDOSTERON A METABOLICKÝ SYNDROM

Recentně byla zkoumána role aldosteronu v metabolickém syndromu a zvláště jeho vlivu na vznik insulinové rezistence. U primárního hyperaldosteronismu byla opakovaně popsána insulinová rezistence, poprvé J. Widimským jr a kolegy⁴⁵, mechanismus jejího vzniku však nebyl zcela jasný.

V roce 2003 byl popsán lidskými adipocyty secernovaný faktor, který 7 krát zvýšil sekreci aldosteronu z kultivovaných lidských adrenálních buněk a na molekulární úrovni 10x zvýšil expresi mRNA pro StaR - steroidní akutní regulační protein⁴⁶. Tuková tkáň je endokrinně aktivní a tento nový protein, respektive dvě působící proteinové frakce, by mohl být pojítkem mezi hyperaldosteronismem a metabolickým syndromem neboli hypertenzí podmíněnou obezitou. Pravděpodobně se jedná o bludný kruh, kdy působky z tukové tkáně zvyšují sekreci mineralokortikoidů a ty pak zhoršují endoteliální dysfunkci i v tukové tkáni a svalech a prohlubují tak insulinovou rezistenci. Na experimentálních studiích s hlodavci bylo prokázáno, že aldosteron je schopen zvýšit expresi prozánětlivých adipokinů zodpovědných za redukci exprese insulinových receptorů a tím snížit insulinem zprostředkovaný transport glukózy do buněk⁴⁷. Aldosteron svým prozánětlivým působením a zvýšením oxidativního stresu také poškozuje signální cesty insulinu⁴⁸. Léčba antagonisty aldosteronu zlepšuje uvolňování insulinu z pankreatu, utilizaci glukózy závislou na insulinu i endotel dependentní vasodilataci⁴⁹.

ALDOSTERON A REZISTENTNÍ HYPERTENZE

Role hyperaldosteronismu byla zkoumána u rezistentní arteriální hypertenze. Ta je definována jako nedostatečně korigovaná arteriální hypertenze i přes léčbu třemi antihypertenzivy, z nichž jedno je diuretikum.

V naší české populaci se u selektovaných pacientů se středně těžkou a těžkou arteriální hypertenzí primární hyperaldosteronismus (PA) vyskytuje až v 19%⁵⁰. Proto je doporučeno u pacientů se středně těžkou a obtížně korigovatelnou arteriální hypertenzí provést screeningové vyšetření poměru hladin aldosteronu/reninu i u pacientů, kteří netrpí hypokalémií⁵¹. Nejčastějšími příčinami PA podle prevalence jsou aldosteron produkující adenom asi 45% a bilaterální adrenální hyperplazie 45%, pak unilaterální adrenální hyperplazie. Vzácné geneticky vázané formy uvedené výše, se vyskytují v jednotkách procent.

Pacienti s rezistentní hypertenzí i po vyloučení sekundarity příčiny hypertenze mají signifikantně vyšší hladiny plasmatického aldosteronu i množství aldosteronu v moči za 24 hodin. U pacientů s rezistentní hypertenzí byly současně popsány vyšší hladiny BNP (brain natriuretic peptide) a ANP (atrial natriuretic peptide), které svědčí pro zvýšení intravaskulárního objemu jako charakteristického rysu rezistentní hypertenze⁵².

Podávání spironolaktonu v malé dávce jako čtvrtého antihypertenziva do kombinační léčby spolu s jiným diuretikem a inhibitorem ACE nebo blokátorem AT1R je na podkladě klinických studií některými autory považováno za optimální a ve vysokém procentu úspěšnou léčbou rezistentní esenciální arteriální hypertenze^{53, 54}. Je však třeba pečlivě monitorovat hladinu kalémie, zvláště u starších pacientů a nemocných s renální insuficiencí.

Obecně platí, že pacienti s rezistentní hypertenzí jsou vysoce riziková a často polymorbidní. Na etiologii a průběhu onemocnění se u nich mohou podílet další faktory. Může se u nich vyskytovat syndrom spánkové apnoe, metabolický syndrom, závažná ateroskleróza v karotickém, koronárním i periferním arteriálním řečišti.

Hladiny aldosteronu jsou také zvýšeny u renovaskulární hypertenze při sekundárním hyperaldosteronismu. Příčinou je stenóza renální tepny, která je potenciálně

mechanisticky léčitelnou příčinou těžké arteriální hypertenze. Zde je hlavní patofyziologickou příčinou hypertenze nadměrná sekrece reninu, který je vylučován z juxtaglomerulárního aparátu při hypoperfúzi ledviny.

ALDOSTERON A REMODELACE MYOKARDU

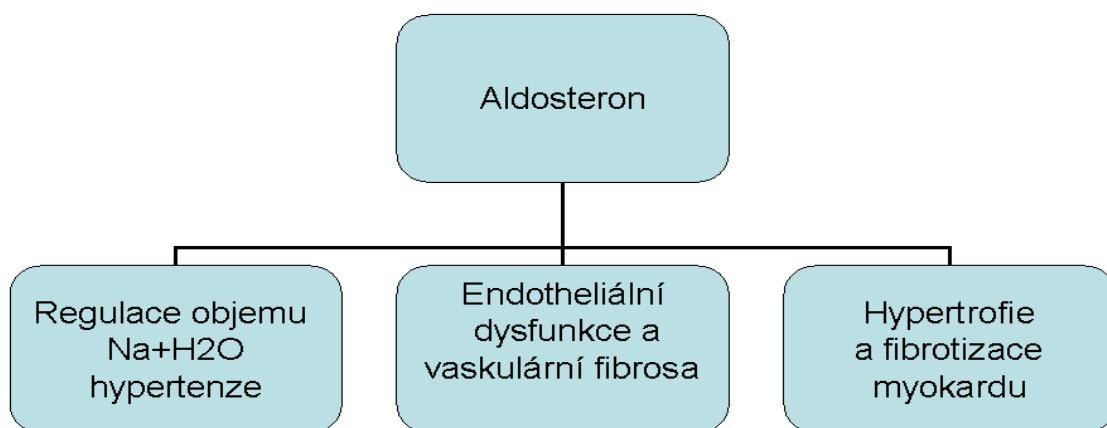
Jedním z nejlépe dokumentovaných účinků aldosteronu na myokard je indukce fibrózy, která má negativní následky na funkci srdce jako pumpy ⁵⁵. Zásadním pro vznik fibrózy v přítomnosti vyšších hladin aldosteronu je nadbytek sodíku respektive expanze extracelulárního objemu ^{56 57 58}. Malou dávkou antagonisty aldosteronu bylo možné zabránit fibróze myokardu, nikoliv však hypertrofii a hypertenzi, zatímco až vysoká dávka tohoto antagonisty aldosteronu dokázala zvrátit všechny uvedené efekty ⁵⁹. Klíčovou buňkou zodpovědnou za fibrotizaci myokardu v patologických stavech je srdeční fibroblast ¹⁹. Role sodíku v patogenezi fibrózy při stavech spojených s vysokou aktivitou systému RAAS ještě není zcela objasněna.

BLOKÁDA RAAS ZA PATOLOGICKÝCH STAVŮ

Za patologických stavů systém RAAS působí negativně na mnoha úrovních kardiovaskulárního aparátu. Primárně působí např. u srdečního selhání jako kompenzační mechanismus, avšak s progresí onemocnění je systém RAAS zodpovědný za řadu negativních změn ⁶⁰. Za hlavní efektor systému RAAS byl považován peptid angiotensin II, který zprostředkovává většinu známých negativních reakcí přes AT1 receptor, avšak další efektor systému - aldosteron působí podobně závažné změny ⁶¹. Retence sodíku vede ke zvýšení systémového krevního tlaku a ke zvýšení preloadu i afterloadu. Zvýšení afterloadu i preloadu podporuje hypertrofii myokardu. Vysoké hladiny aldosteronu za patologických stavů působí troficky také přímo na buňky myokardu a působí ukládání vaziva v myokardu a v cévách, včetně věnčitých, kde aldosteron navozuje endoteliální dysfunkci a zhoršuje tak perfúzi zatěžovaným myokardem. Vzhledem k dysbalanci prokoagulačních a antikoagulačních faktorů při endoteliální dysfunkci může docházet i ke vzniku mikrotrombóz v koronárním kapilárním řečišti ⁶².

Inhibice účinků aldosteronu může navodit regresi hypertrofie a fibrotizace levé komory srdeční na zvířecích modelech ⁵⁹ i u lidí, zvláště u pacientů s esenciální hypertenzí ^{63 64} a městnavým srdečním selháním. V multicentrické studii s inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu CONSENSUS byl prokázán vztah mezi plasmatickou hladinou aldosteronu a mortalitou u pacientů se srdečním selháním ⁶⁵.

V současné době se používají tři látky účinně blokující mineralokortikoidní receptor jednak perorální spironolakton, pak intravenózně podávaný kalium kankreonát, který je teprve metabolizován v játrech na účinnou látku kankrenon. Nejnovějším používaným antagonistou aldosteronu je perorální eplerenon selektivní antagonist mineralokortikoidního receptoru, který nemá některé negativní antiandrogenní účinky, které má spironolakton – např. gynekomastii a ztrátu libida. Váže se cca 500x méně k androgenním a estrogením receptorům než spironolakton ⁶⁶.



Obr. 2. Patofyziologické působení aldosteronu.

KLINICKÉ POUŽITÍ FARMAKOLOGICKÉ BLOKÁDY MINERALOKORTIKOIDNÍHO RECEPTORU (MR) PRO ALDOSTERON

Léčebná účinnost blokády systému renin angiotensin aldosteron, zprvu hlavně inhibice konverze angiotensinu I na angiotensin II byla prokázána v mortalitních klinických studiích ⁶⁵. Byl však popsán fenomén úniku aldosteronu, respektive přetrvávající vysoké hladiny aldosteronu u pacientů se srdečním selháním i arteriální hypertenzí a účinnou blokádou angiotensin konvertujícího enzymu ^{61 67}.

Proto byla v dalších studiích zkoumána možnost přidání selektivní inhibice receptorů pro aldosteron. Poprvé ve velkém měřítku ve studii RALES, ve které pacientům, kteří již užívali inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu a měli těžké srdeční selhání s ejekční frakcí levé komory srdeční pod 30% ve funkční třídě NYHA III a NYHA IV, bylo přidáno k léčbě 25 mg spironolaktonu denně. Tato studie na 1600 pacientech prokázala 30% redukci mortality ⁶⁸. Navázala na ni studie EPHESUS ve které bylo zahrnuto 6000 pacientů se srdečním selháním na podkladě akutního infarktu myokardu ⁶⁹. I zde došlo k výrazné redukci mortality, překvapivě však nejvíce díky redukci náhlé srdeční smrti podobně jako ve studii RALES.

Další studie EMPHASIS-HF u pacientů s mírnějším srdečním selháním s EF LK pod 35% a funkční klasifikací NYHA II prokázala redukci kardiovaskulární i celkové mortality a nutnosti hospitalizace pro srdeční selhání a pro jednoznačný benefit podávání eplerenonu byla předčasně zastavena ⁷⁰. Tyto tři studie jednoznačně a konzistentně prokázaly příznivý vliv léčby antagonisty mineralokortikoidního receptoru na mortalitu a v metaanalýze i vliv na remodelaci levé komory srdeční u pacientů se srdečním selháním bez ohledu na funkční kapacitu ⁷¹.

VLIV RAAS A ALDOSTERONU NA ELEKTRICKOU AKTIVITU MYOKARDU

Většina zachráněných životů ve studii EPHESUS a RALES byla na vrub redukce incidence náhlé srdeční smrti u pacientů užívajících blokátory aldosteronu. Náhlá smrt u pacientů s pokročilým srdečním selháním je nejčastěji způsobena maligní arytmií, většinou fibrilací komor. Tento náález znamenal, že systém RAAS, respektive aldosteron a jeho blokáda, přímo ovlivňuje arytmogenní potenciál myokardu.

Jedním z možných vysvětlení je snížení prozánětlivého efektu, který má aldosteron a zmírnění fibrotizace myokardu a tím i snížení pozánětlivé neuspořádanosti (disarray) kardiomyocytů. Dalším možným efektem je perivaskulární fibróza, která zhoršuje ischemii již tak přetěžovaného myokardu. Tento efekt je však výrazně dlouhodobý. Dalším je deplece hořčíku Mg^{++} vlivem aldosteronu, kterou lze zvrátit podáváním antagonistů aldosteronu. Je známo, že plasmatická hladina magnesia koreluje s výskytem arytmií. V experimentu bylo prokázáno časné působení antagonisty aldosteronu spironolaktonu na výskyt arytmií, které nelze vysvětlit změnami plasmatické koncentrace magnesia. Bylo zjištěno, že aldosteron zvyšuje efekt působení noradrenalinu na sympatických zakončeních tím, že blokuje uptake noradrenalinu, který může tak déle a ve větší koncentraci působit na adrenergní receptory. Inhibice spironolaktonem zvyšuje uptake noradrenalinu jak bylo prokázáno studiemi s analogem noradrenalinu - radioaktivně značeným MIBG ¹².

Aldosteron také působí na elektrickou aktivitu v síních. Pacienti s fibrilací síní mají zvýšené plasmatické hladiny aldosteronu ⁷². Léčba eplerenonem snižuje inducibilitu fibrilace síní ^{73 74} a pacienti s primárním aldosteronismem mají 12x vyšší pravděpodobnost vzniku fibrilace síní než kontroly s esenciální hypertenzí a stejným krevním tlakem ⁷⁵. Na psím modelu perzistentní fibrilace síní podávání spironolaktonu snižovalo oproti placebo apoptotickou smrt buněk, myolýzu, profibrotickou aktivitu, mitochondriální otok a udržovalo funkční parametry jako ejekční frakci levé síně ⁷⁶.

LOKÁLNÍ SYSTÉM RAAS

Původně bylo předpokládáno, že systém RAAS působí systémově s tím, že v ledvinách a nadledvinách jsou hlavní řídicí centra. Bylo však prokázáno, že systém RAAS je také syntetizován lokálně v určitém orgánu např. v myokardu nebo v ledvině, kde pak působí specificky parakrinně a autokrinně ⁷⁷.

Ze zvířecích modelů srdečního selhání, z dat pacientů se srdečním selháním a z experimentů na zvířatech s excesem mineralokortikoidů víme, že RAAS resp. sekundární hyperaldosteronismus navozený srdečním selháním, ač zprvu působí jako kompenzační mechanismus, má z dlouhodobého hlediska negativní vliv a je součástí circulus vitiosus ⁶⁰. Mineralokortikoidy respektive aktivace mineralokortikoidního receptoru má zprvu adaptační a posléze výrazně negativní vliv na kardiomyocyty, myofibroblasty a buňky hladkého svalstva jako indukci apoptózy, zvýšení oxidativního stresu, progresi zánětu a fibrózu. Toto negativní působení může být zastaveno bloádou mineralokortikoidních receptorů v dávce, která zdaleka neovlivňuje systémový krevní tlak, což potvrzuje význam mineralokortikoidního vlivu na srdce, který není závislý na presorické reakci a snížení preloadu a afterloadu ⁵⁷.

Renin je s největší pravděpodobností secernován pouze v ledvinách a je vychytáván na membránách v intersticiálním prostoru v srdci a cévních stěnách, kde reninový receptor váže renin a prorenin ⁷⁸. Zde hlavně v intersticiálním prostoru může štěpit angiotensinogen na Ang I, který pak může být štěpen ACE – konvertujícím enzymem na Ang II, který se váže na AT1 receptor. Hlavní přeměna cirkulujícího Ang I na Ang II probíhá v plicní cirkulaci. Lokální hladiny angiotensinu II v myokardu však mohou být až 20x vyšší než v plasmě. Ang II spolupůsobí na efektech působených aktivovaným mineralokortikoidním receptorem a také zvyšuje hladinu aldosteron syntázy. Za většinu negativních efektů, zvláště hypertrofie a fibrotizace je ale podle posledních poznatků zodpovědný právě aktivovaný mineralokortikoidní receptor ^{44 77}.

V experimentu na zvířatech byla prokázána zvýšená syntéza aldosteronu přímo v myokardu po infarktu. Zvýšení lokální hladiny aldosteronu bylo zprostředkováno angiotensinem II vazbou na AT1 receptor ²¹.

Dále bylo prokázáno zvýšení syntézy aldosteronu v myokardu u pacientů s esenciální hypertenzí bez dysfunkce levé komory srdeční srovnáváním koncentrací

aldosteronu v koronárním sinu a systémové cirkulaci ⁷⁹. Podobně pak bylo prokázáno zvýšení lokálních koncentrací aldosteronu stejnou technikou u pacientů se srdečním selháním ⁸⁰. Satoh a kolegové prokázali přímo v bioptických vzorcích selhávajícího myokardu zvýšenou expresi aldosteron syntázy (CYP11B2), která přímo korelovala s množstvím kolagenu ve vyšetřované části myokardu ⁸¹.

Za fyziologických podmínek je u zdravých krys lokální koncentrace mRNA aldosteron syntázy asi 100x vyšší v nadledvinách než v srdci a koncentrace aldosteronu se v srdci 17x zvýší oproti plasmě jako odpověď na stimulaci angiotensinem II ⁸². Aldosteron tedy pravděpodobně působí lokálně jako auto a parakrinní hormon a je možné, že je zodpovědný za většinu proliferativních efektů, které byly dříve připisovány angiotensinu II ⁸¹.

Za fyziologických podmínek role lokálního systému RAAS spočívá pravděpodobně v udržování homeostázy a relativně malých lokálních reakcích na změny, zvláště napětí, v myokardu; zatímco systémově působí RAAS v regulaci extracelulárního objemu neboli hospodaření se sodíkem a vodou.

Z recentních prací vyplývá, že za patologických stavů vzrůstá důležitost role lokálních systémů RAAS např. v srdci a ledvině, které zásadně ovlivňují stav a prognózu poškozených nebo selhávajících orgánů.

BIOSYNTÉZA ALDOSTERONU, REGULACE TVORBY ALDOSTERONU A ALDOSTERON SYNTÁZA - CYP11B2

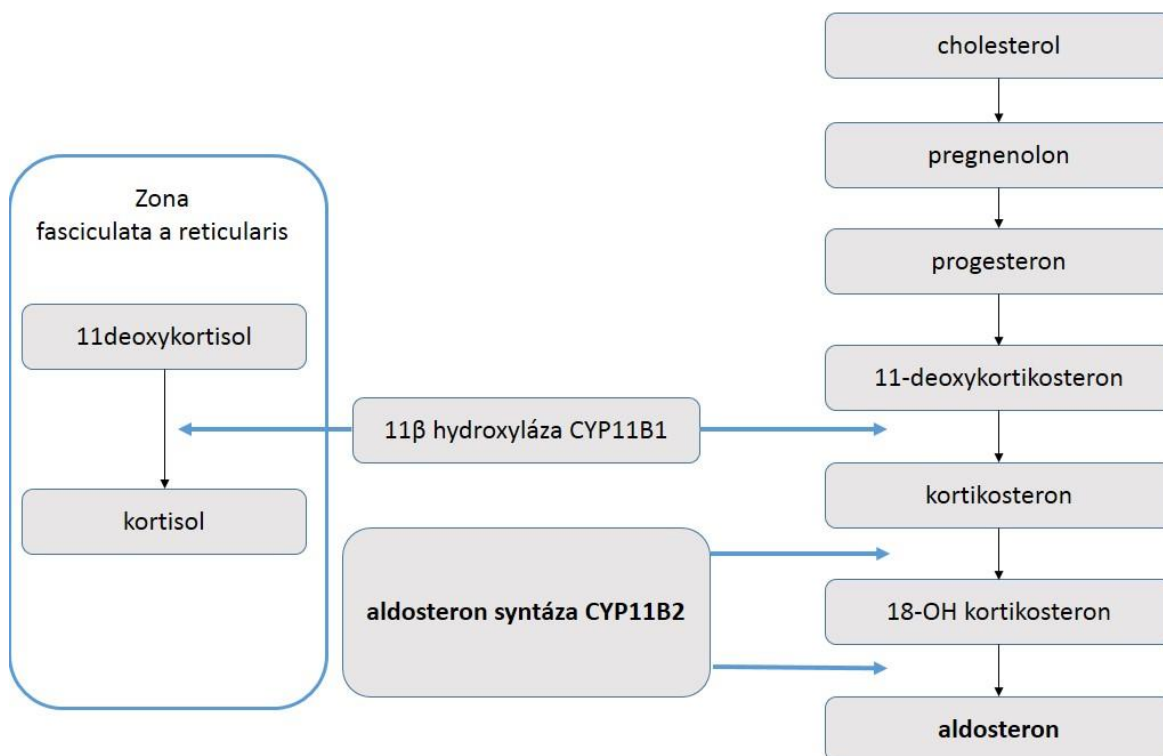
SYNTÉZA ALDOSTERONU

Aldosteron je syntetizován v mitochondriích převážně v zona glomerulosa v kůře nadledvin. Jeho syntéza byla popsána i v jiných orgánech - v srdci, cévní stěně, CNS a v tukové tkáni.

Prvním zásadním krokem je transport cholesterolu přes mitochondriální membránu zprostředkovaný steroidogenním akutním regulačním proteinem (StAR), tento krok je společný pro steroidogenezi všech steroidních hormonů a určuje rychlost syntézy všech steroidů. Poté je cholesterol konvertován na aldosteron sérií enzymatických reakcí katalyzovaných dehydrogenázami a oxidázami patřících do velké rodiny cytochromu P450 (CYP), které obsahují v aktivním místě hem. K jejich funkci je potřeba reduktázový systém, který transferuje elektrony a umožňuje hydroxylační reakce ⁸³.

První reakcí je konverze cholesterolu na pregnenolon, ten je pak v cytosolu na membráně hladkého endoplasmatického retikula konvertován na progesteron, který je 21-hydroxylován na 11-deoxycorticosteron (DOC), ten je pak ve třech krocích konvertován na aldosteron jedním enzymem aldosteron syntázou (CYP11B2) (11-hydroxylace na kortikosteron, 18-hydroxylace na 18-hydroxycorticosteron a nakonec 18-methyloxidace na aldosteron) ²⁰.

Aldosteron syntáza je vysoce podobná 11 β -hydroxyláze CYP11B1, která katalyzuje přeměnu 11-deoxykortizolu na glukokortikoid kortizol. Oba dva geny jak CYP11B2 i CYP11B1 jsou lokalizovány tandemově na osmém chromozomu (8q21-22) a vykazují vysokou homologii.



Obr. 3. Schéma biosyntézy aldosteronu

REGULACE SYNTÉZY ALDOSTERONU

Aldosteron je tvořen a regulován převážně v rámci systému RAS působením angiotensinu II na AT₁ receptory (AT₁R) buněk zóna glomerulosa v kůře nadledvin.

Angiotensin II se váže na AT₁R spřažený s G proteiny, které aktivují fosfolipázu C, která stimuluje intracelulární produkci inositol trifosfátu a uvolňuje intracelulárně uložené vápníkové ionty, které aktivují řadu transkripčních faktorů zvláště NURR1 (Nuclear receptor related protein 1) a NGF1-B neboli NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) ⁸⁴ a další, které se váží k 5'konci genu pro aldosteron syntázu a zvyšují tak její transkripci ⁸⁵.

Důležitým regulátorem syntézy aldosteronu je endotelin – ET₁. Endotelin zvyšuje transkripci aldosteron syntázy přes endotelinové receptory v zóna glomerulosa nadledvin, a v některých pracích byl hodnocen jako ekvipotentní stimulátor sekrece k angiotensinu II ⁸⁶. V pokusu na zvířeti ET₁ vede ke stimulaci DNA a proliferaci buněk kůry nadledvin ⁸⁷.

Dalším regulujícím faktorem je ACTH (kortikotropin), který hlavně reguluje expresi 11 β -hydroxylázy, která kromě syntézy kortizolu vytváří kortikosteron - substrát pro aldosteron syntázu, bez něhož není syntéza aldosteronu možná.

Tvorba aldosteronu je také řízena na angiotensinu II nezávislými vlivy – především plasmatickou koncentrací draslíku. Draslík přímo depolarizuje membránu a otevírá vápníkové L a T kanály, skrze které dochází k vzestupu plasmatické koncentrace kalcia a aktivaci kalmodulinu, což dále vede k fosforylaci transkripčních faktorů a ke zvýšení transkripce aldosteron syntázy, která katalyzuje poslední krok biosyntézy aldosteronu a určuje tak rychlost tvorby a sekrece aldosteronu ²⁰.

CYP11B2 - GEN PRO ALDOSTERON SYNTÁZU

Změny uspořádání v genu aldosteron syntázy CYP11B2 mohou vést k nepřiměřené sekreci aldosteronu a následkem toho k vysokému krevnímu tlaku jako např. u glukokortikoidy supresibilního hyperaldosteronismu ⁵. Jiné mutace tohoto genu mohou vést ke ztracení soli a hypotenzi. Z těchto důvodů je zřejmé, že aldosteron syntáza - CYP11B2 je jedním z pilířů homeostázy soli a vody a tím i krevního tlaku ⁸⁸.

V oblasti jejího distálního promotoru byl popsán polymorfismus T-344C, v místě vazby steroidogenního faktoru 1 (SF-1), který je pozitivním regulátorem hydroxyláz steroidních hormonů a klíčovým faktorem vývoje steroidogenních buněk ⁸⁹. Je tedy možné, že se polymorfismus T-344C může podílet na výsledné aktivitě aldosteron syntázy a tím na průběhu aldosteronem modulovaných patofyziologických procesů.

Další polymorfismus byl popsán v intronu 2 (I2), kdy je původní intron (divoká varianta) CYP11B2 nahrazen intronem ze sousedního genu (converse) pro 11 β -hydroxylázu CYP11B1 s alelami (wild-type/converse). Polymorfismus v místě pro vazbu SF-1 a polymorfismus intronu 2 (I2) jsou ve vzájemné vazbě ⁸⁹.

INHIBITORY ALDOSTERON SYNTÁZY

Nově byl syntetizován perorální inhibitor aldosteron syntázy LCI699 a již byl použit na lidech, kde u pacientů s primárním hyperaldosteronismem efektivně snížil systémovou plasmatickou hladinu aldosteronu ⁹⁰. Jeho efekt na krevní tlak u esenciální hypertenze v dávce 1 mg denně snižuje systolický krevní tlak o 12 mm a diastolický o 7 mm Hg, což je srovnatelné s podáváním 100 mg eplerenonu denně ⁹¹. Ve vyšších dávkách tento inhibitor částečně blokuje CYP11B1 (která cca z 93% shodná s CYP11B2) – a tím částečně blokuje přeměnu deoxykortikosteronu na kortizol. Tím dochází ke hromadění 11-deoxykortikosteronu a zpětnou vazbou se zvyšuje se hladina ACTH.

Teoretickou výhodou použití selektivního inhibitoru aldosteron syntázy oproti inhibici mineralokortikoidního receptoru je fakt, že podávání inhibitorů MR receptoru zvyšuje zpětnou vazbou plasmatické hladiny aldosteronu. Aldosteron nepůsobí pouze na MR receptor, ale má i přímý negenomický efekt (např. vasokonstrikci), který nelze zablokovat podáváním antagonistů MR. Přímé vysoce selektivní inhibitory aldosteron syntázy by tak měly potenciál blokovat jak genomické tak negenomické efekty aldosteronu ⁹².

HYPERTROFIE MYOKARDU

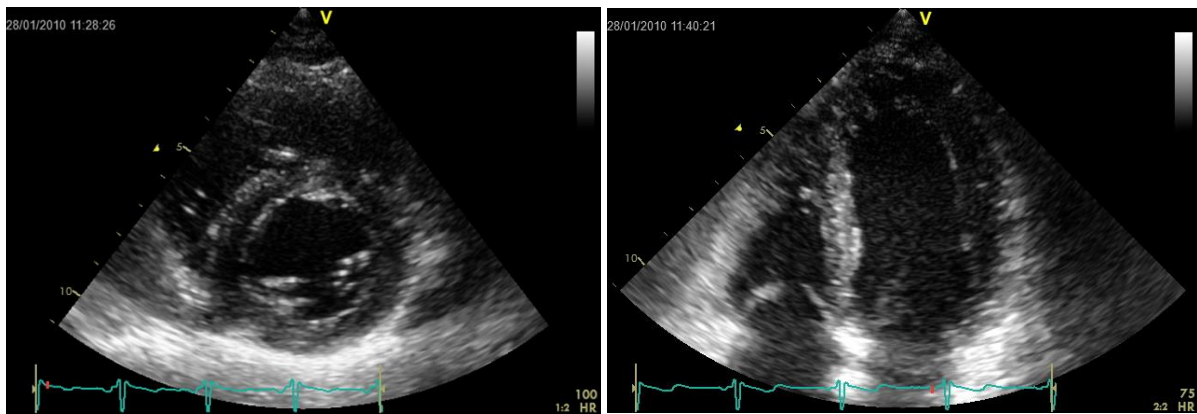
TYPY HYPERTROFIE MYOKARDU A DIAGNOSTIKA

U myokardu můžeme rozlišit několik druhů hypertrofie. Patofyziologicky se jedná buď o hypertrofii jako reakci na zátěž např. u mladých atletů, hypertrofii jako reakci na zátěž u patologických stavů jako u arteriální hypertenze nebo stenózy aortální chlopně, dále hypertrofii na podkladě genetické poruchy kontraktilních proteinů jako u hypertrofické kardiomyopatie, hypertrofii na podkladě ukládání metabolitů v buňkách u strádavých onemocnění např. u Fabryho nemoci a hypertrofii na podkladě ukládání amyloidu v intersticiu u amyloidózy.

Hypertrofie kardiomyocytu je buněčnou odpovědí na zvýšené biomechanické napětí. Hypertrofií dochází k normalizaci zvýšeného napětí ve stěně. Dochází ke zvětšení kardiomyocytů, zvýšení proteosyntézy a změně v organizaci sarkomer. Hypertrofie byla vnímána jako adaptační odpověď organismu, která umožnila udržet srdeční výdej i při déle trvajícím zvýšeném zatížení komory. Dlouhotrvající hypertrofie je však spojena s výrazně vyšším rizikem náhlé srdeční smrti nebo progresí do srdečního selhání³. Z pozorování v klinických studiích je známo, že inhibice systému renin angiotensin aldosteron může vést k regresi hypertrofie a ke snížení rizika úmrtí i progresu srdečního selhání jako např. ve studii HOPE⁹³.

Z morfologického hlediska můžeme pak rozlišovat hypertrofii podle relativní tloušťky stěn levé komory (RWT relative wall thickness), která je definována jako součet tloušťky septa a zadní stěny levé komory (LK) dělené diastolickým rozměrem LK. Kromě normy tak můžeme rozlišit koncentrickou remodelaci, kdy dochází pouze ke zvýšení hodnoty relativní tloušťky stěn, ale není zvýšen index hmotnosti levé komory srdeční, hypertrofii koncentrickou a excentrickou, kdy při excentrické hypertrofii dochází k dilataci komory, u koncentrické hypertrofie k dilataci komory nedochází. Koncentrickou hypertrofii nalézáme typicky u tlakového přetížení levého srdce např. u arteriální hypertenze nebo aortální stenózy, excentrickou hypertrofii u objemového přetížení typicky např. u regurgitačních chlopenních vad.

Za normální hmotnost levé komory srdeční jsou považovány arbitrární hodnoty, které se pohybují od 111 do 134g/m² pro muže a od 100 do 125 g/m² pro ženy³.



Obr. 4. Echokardiografický obraz koncentrické hypertrofie levé komory srdeční u pacienta s arteriální hypertenzí.

MECHANISMY PŮSOBÍCÍ HYPERTROFII MYOKARDU

Kromě stimulace napětím prostřednictvím signálů z mechanosenzitivních iontových kanálů působí proliferativně i některé hormony, které mohou být vylučovány systémově i lokálně auto a parakrinně např. lokální systém RAAS a adrenergní systém.

Adrenalin a noradrenalin působí na membránové β receptory, které po aktivaci přes G protein stimulují adenylát cyklázu a protein kinázu A (PKA), která působí na kalciové kanály L typu, které vedou k aktivaci kalmodulinu a kalcineurinu, který defosforyluje transkripční faktory NFAT. Tyto transkripční faktory putují do jádra a aktivují příslušné responsivní elementy ⁹⁴.

Angotensin II stimuluje AT1 receptor, který přes G protein aktivuje fosfolipázu C a přes kalmodulin ovlivňuje kalcinerurin a pravděpodobně stejnou cestou ovlivňuje transkripci.

Kalcineurin je serin-threonin fosfatáza, která je pravděpodobně zahrnuta ve většině cest patologické hypertrofie kardiomyocytu a pravděpodobně i běžné hypertrofie.

G $\beta\gamma$ dependentní fosfoinositol 3 kináza (PI3K) je také aktivována při hypertrofii myokardu, má vliv na velikosti myokardiální buňky v závislosti na tlakovém zatížení. PI3K a následně působí na serin threonin kinázu Akt známou také jako protein kinázu B (PKB). Akt /PKB je aktivována vazbou fosforylovaných inositidů.

Akt/PKB dále přímo fosforyluje GSK3 β (kinázu glykogen syntázy), široce exprimovanou kinázu, jejíž fosforylace, která ji inaktivuje, je nutná ke vzniku hypertrofie. Inaktivace fosforylací GSK3 β byla popsána při působení isoprenalinu přes betareceptor, endotelinu a fenylefrinu. GSK3 β fosforyluje množství serin/threoninových zbytků na N terminálních regulačních koncích NFAT (proteinů, čímž dojde k zakrytí jejich nukleární sekvence pro import a dojde k jejich translokaci do cytoplasmy a inaktivaci ⁹⁵.

GSK3 β pravděpodobně integruje různé signální hypertrofické cesty a její aktivace je pravděpodobně nutná pro rozvoj mnoha forem hypertrofie myokardu. Mezi kaskádou PI3K/Akt/ GSK3 β a calcineurin/NFAT existuje vzájemné působení podporující jejich úzké propojení jako dvou hlavních signálních cest v růstu kardiomyocytu ⁹⁶.

Působením angiotensinu II dochází k lokální produkci aldosteronu v myokardu ^{81 80}. Lokálně vytvořený aldosteron aktivuje mineralokortikoidní receptory v srdci (v kardiomyocytech, fibroblastech, hladkých svalových buňkách věnčitých cév a monocytech), které působí zvýšení exprese AT₁ receptoru a exprese ACE. Tím je vytvořen mechanismus pozitivní zpětné vazby v aktivaci lokálního RAAS, který kromě trofického efektu zvyšuje i aldosteronem indukovaný oxidativní stres ^{3, 97-99}. Postupně s progresí hypertrofie současně dochází v myokardu, převážně aktivací mineralokortikoidního receptoru ve fibroblastech, i k depozici vaziva - fibróze, která vede k diastolické dysfunkci levé komory srdeční ¹⁰⁰.

HODNOCENÍ HYPERTROFIE POMOCÍ ZOBRAZOVACÍCH METOD

K hodnocení hypertrofie je nejběžněji užívanou vyšetřovací metodou echokardiografie, která je široce dostupná a dostatečně dobře reprodukovatelná. Současně vyloučí jiné potenciální příčiny hypertrofie jako např. chlopenní vady.

Další možností je CT vyšetření, které se provádí většinou primárně jako CT angiografie koronárních tepen, kdy s pomocí moderních rychlých multidetektorových přístrojů lze získat vysoce kvalitní 3D zobrazení veškerého myokardu v systole i diastole, dochází však při něm k radiační zátěži pro pacienta.

Stále častěji je využívána magnetická rezonance, která je schopna získat i dynamický obraz všech srdečních oddílů během srdeční revoluce a poskytnout zásadní informace pro diferenciální diagnostiku zvláště v případě amyloidózy, střeďavých a dalších kardiomyopatií např. arytmogenní dysplazie pravé komory. Spolu v kombinaci s echokardiografickým vyšetřením a biopsií myokardu může magnetická rezonance přinést maximum diagnostických informací o způsobu poškození myokardu.

Výhodou CT i NMR zobrazení je nezávislost na vyšetřujícím a obrovské možnosti postprocesingu získaných dat. Relativní nevýhodou magnetické rezonance je vyšší cena a dostupnost.

POLYMORFISMUS ALDOSTERON SYNTÁZY T-344C A VZTAH K HYPERTENZI A HYPERTROFII MYOKARDU

V souvislosti s polymorfismem aldosteron syntázy T-344C bylo popsáno několik korelací. Studie byly často prováděny na souborech, kde vztah genotypu a fenotypu mohl být ovlivněn mnoha zavádějícími faktory například antihypertenzní léčbou nebo u žen hormonálními změnami, které mohou ovlivnit výši naměřených hodnot.

Mechanismus, jakým může polymorfismus aldosteron syntázy v oblasti vazby SF-1 přispívat k výši krevního tlaku byl popsán výše. Steroidogenní faktor 1 (SF-1) se váže k DNA v promotorové oblasti aldosteron syntázy v místě polymorfismu k alele TT 4x slaběji než k alele C ⁸⁹, což by mohlo vysvětlit snazší možnost vazby jiných zatím neznámých transkripčních faktorů do blízkosti zmíněného polymorfismu v oblasti promotoru, protože SF-1 nereguluje přímo aktivitu aldosteron syntázy ⁸⁵.

CYP11B2 A HYPERTENZE

Z některých studií zabývajících se vztahem krevního tlaku k T-344C polymorfismu vycházely zpočátku rozporupné závěry.

Většinou však byla alela T asociována častěji s hypertenzí jako např. ve studii Davies a spolupracovníků ¹⁰¹ nebo s vyššími hladinami aldosteronu jako ve studii Staessena na 1461 probandech ¹⁰². Podobně v podskupině těžkých hypertoniků s nástupem hypertenze do 60 roku věku a vyšším body mass indexem (BMI > 27kg/m²) Brand a spolupracovníci popsali korelaci výše krevního tlaku s -344T alelou ¹⁰³. Na druhé straně rozsáhlá japonská studie „Suita“ na 4000 probandů neprokázala vliv tohoto polymorfismu na výši krevního tlaku u léčených i neléčených hypertoniků a zdravých kontrolách ¹⁰⁴.

Oproti tomu na severoevropské populaci, popsala Kurland statisticky významně výraznější redukci systolického krevního tlaku po 3 měsících léčby irbesartanem, blokátorem AT₁ receptorů pro angiotensin II (ARB), u probandů s TT genotypem než u genotypu CC a TC. Tato korelace neplatila pro pacienty léčené betablokátozem na relativně malém souboru, ale v dvojité zaslepené randomizované studii SILVHIA ¹⁰⁵.

Je otázkou, jakou roli mohou hrát rasové rozdíly ve vztahu jednotlivých genotypů k intermediárnímu fenotypu.

Na populačním vzorku zdravých 84 finských dobrovolníků, mužů i žen ve věku 36-37 let popsal Kupari a kol. pozitivní statisticky významnou korelaci CC genotypu s enddiastolickým rozměrem levé komory srdeční. ¹⁰⁶. Podobně popsal i Delles a kol. větší enddiastolický rozměr LK u genotypu CC, ale vyšší absolutní i relativní tloušťku stěny LK u genotypu TT. Po zátěži solí došlo ke zvýšení exkrece sodíku v moči pouze u nositelů genotypu TC a TT a ne u CC. Také hladiny aldosteronu poklesly u genotypu TT a TC v reakci na perorální nálož solí, ale nepoklesly u genotypu CC ¹⁰⁷.

Dále byla v italské populaci zjištěna pozitivní korelace hmotnosti LK srdeční a tloušťky volně stěny levé komory s množstvím vyskytujících se T alel u neléčených hypertoniků středního věku ¹⁰⁸.

HYPOTÉZA

Polymorfismus aldosteron syntázy v oblasti jejího promotoru -344 T/C, v místě, kam se váže steroidogenním faktor SF-1, ovlivňuje hmotnost levé komory srdeční a výši krevního tlaku.

CÍLE PRÁCE

Sledovali jsme, zda polymorfismus T-344C genu aldosteron syntázy může mít vliv na výši krevního tlaku a masu levé komory srdeční.

Dále jsme zjišťovali, zda může mít vliv na hladiny některých humorálních působků, zvláště reninu a aldosteronu.

Zjišťovali jsme vztah genotypu pro aldosteron syntázu k závažnosti hypertenze na souboru s rezistentní hypertenzí, hypertenzí korigovanou léčbou a skupinou zdravých kontrol odpovídajícího věku.

METODY

STUDOVANÉ POPULAČNÍ SOUBORY

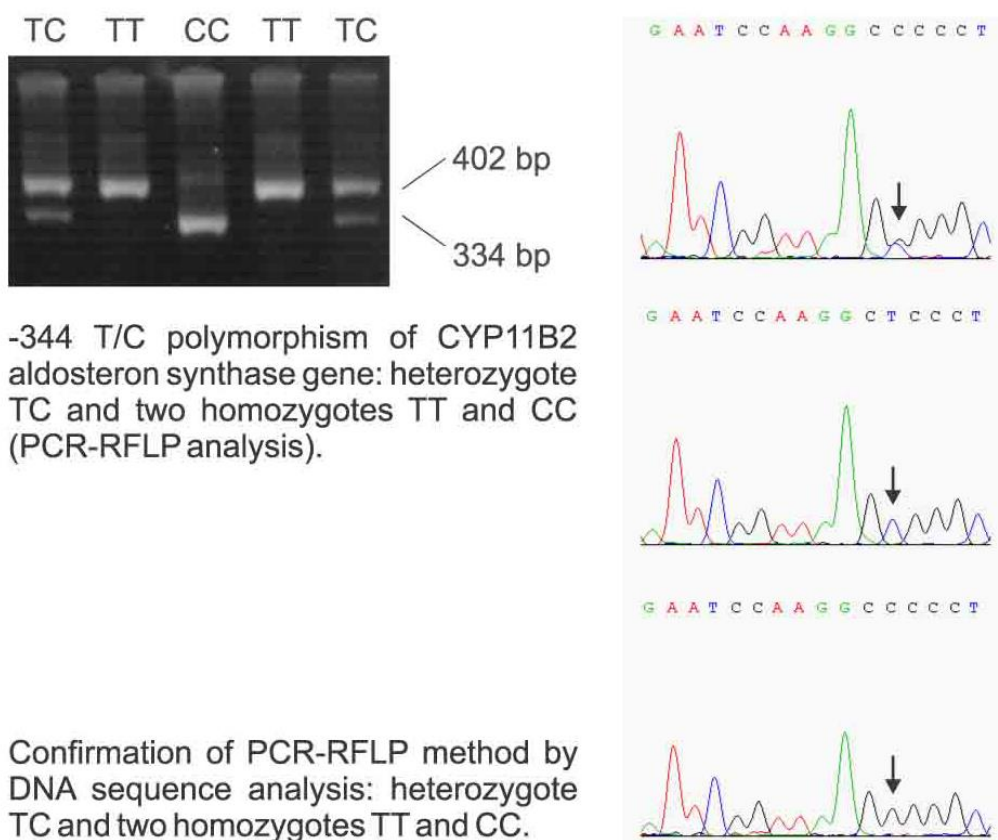
Pro svou prvotní pilotní práci jsem měl k dispozici původně dvě sestavy jednak normotenzních potomků z hypertenzních rodin ($n=56$) a kontroly normotenzních potomků z normotenzních rodin ($n=56$). Tyto jsme vyšetřovali na T-344C polymorfismus aldosteron syntázy a hledali korelaci s krevním tlakem a humorálními parametry, které již dříve byly podrobně vyšetřeny¹⁰⁹. Normotenzní synové hypertenzních rodičů vykazovali jisté rozdíly oproti synům z normotenzních rodin. Měli vyšší glykemii, vyšší hladinu adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu a nižší bazální plasmatickou hladinu aldosteronu. Tato zajímavá zjištění byla v souladu s publikovanými daty v písemnictví¹¹⁰, avšak ve vztahu k polymorfismu aldosteron syntázy jsme našli pouze jistou korelaci s poměrem plasmatických hladin renin/aldosteron, avšak směrodatná odchylka v hladinách aldosteronu byla tak velká, že jsme nedosáhli statistické významnosti. Zjistili jsme pouze trend, který mohl být chybou malých čísel. Proto jsme se pokusili najít korelace s masou levé komory a humorálními parametry u jiného více homogenního souboru 113 mladých zdravých dobrovolníků ve věku 27 ± 5 let.

Na základě pozitivních nálezů ve vztahu genu pro aldosteron syntázu k hypertrofii levé komory srdeční na homogenním souboru mladých dobrovolníků jsme pak v druhé době hledali vztah k arteriální hypertenzi a dovyšetřili soubor 74 rezistentních hypertoniků a 139 hypertoniků, kteří měli léčbou korigovaný krevní tlak a srovnali se je 156 zdravými kontrolami odpovídajícího věku.

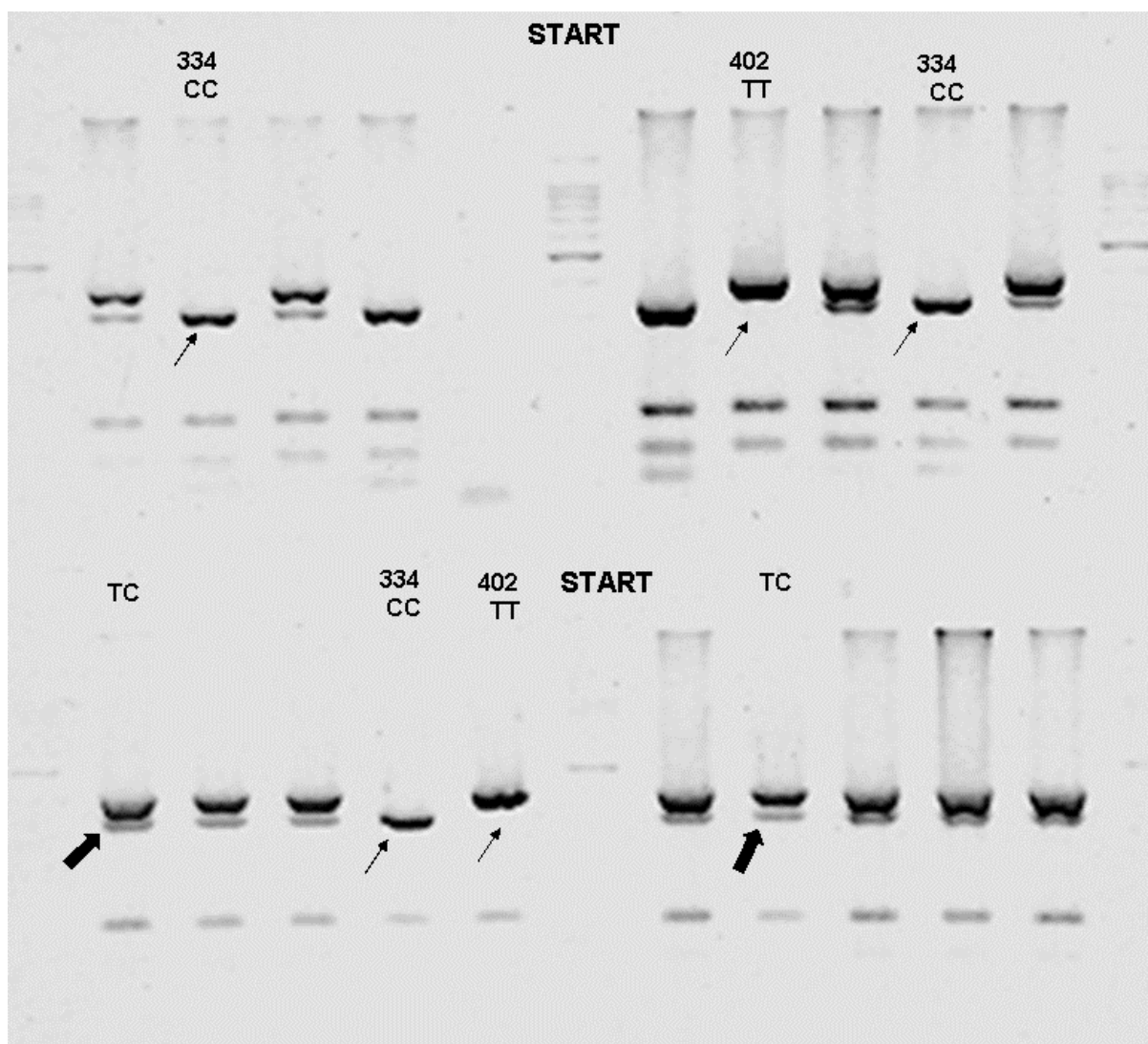
METODIKA STANOVENÍ POLYMORFISMU ALDOSTERON SYNTÁZY.

DNA jsme extrahovali z periferních leukocytů jednotlivých probandů. Poté jsme provedli polymerázovou řetězcovou reakci PCR Taq polymerázou fy Boehringer Ingelheim za použití oligonukleotidových primerů o délce 29 bazí, které jsou specifické pro daný segment DNA, kterou jsme chtěli amplifikovat. Tím jsme získali potřebné množství fragmentů DNA vhodných k následnému štěpení restričními enzymem. Pro zlepšení specifity jsme použili hot start a tzv. touch down, kdy jsme

postupně snižovali v každém cyklu teplotu, při které dochází k annealingu odpovídajících fragmentů a primerů, minimalizuje se tak riziko amplifikace jiných nechtěných fragmentů, které by vnášely do výsledků nepatřičný šum. Výsledkem bylo vytvoření fragmentu o délce 636 párů bazí. Tento fragment jsme následně štěpili restričním enzymem HAE III. Metoda RFLP – polymorfismu restričních fragmentů spočívá v tom, že restriční enzym v tomto případě HAE III štěpí v daném místě pouze jednu z alel a druhou ne, čímž vytvoří fragmenty různé délky. My jsme získali fragmenty pro alelu T 402, 138, 51 a 48 a pro alelu C 334, 138, 69, 51 a 48. Takto naštěpené fragmenty jsme podrobili elektroforéze v metaphoragarosovém gelu a vizualizovali je pomocí ethidium bromidu v ultrafialovém světle. Vzorek amplifikovaných fragmentů byl také současně sekvenován pro potvrzení přesnosti RFLP metodiky.



Obr. 5. potvrzení přesnosti PCR -RFLP metody sekvenční analýzou.



Obr. 6. Elektroforéza v gelu. Lehčí fragmenty putují v gelu rychleji. Heterozygoti mají dva proužky tj. 402 (T) a 334 (C) - (tlusté šipky). Homozygoti mají pouze jeden proužek, ale silnější (tenké šipky).

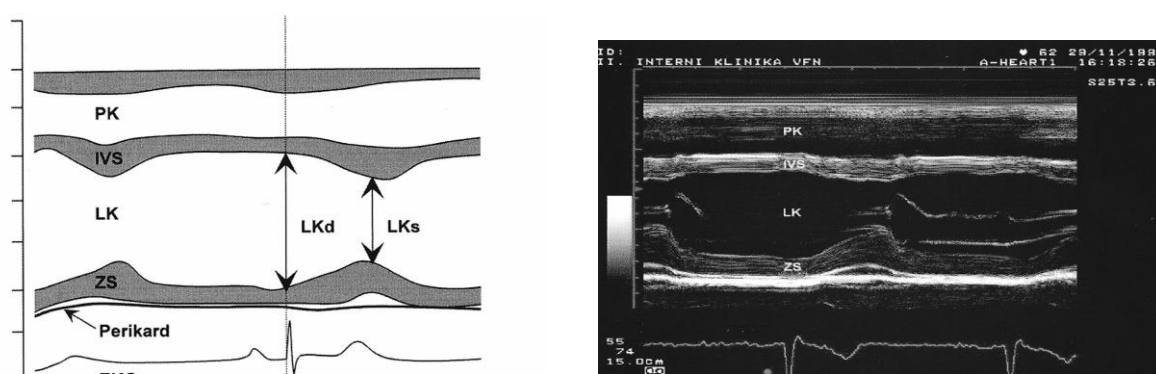
STANOVOVÁNÍ HORMONÁLNÍCH HLADIN

Hladiny plasmatického aldosteronu byly stanovovány radioimunoesejí (Immunotech) a vyjádřeny jako pikogramy na mililitr (pg/ml). Plasmatická reninová aktivita byla hodnocena též radioimunoesejí (Immunotech) v nanogramech na mililitr za hodinu (ng/ml/h). Vzorke krve byly odebírány vždy nalačno mezi 8 a 10 hodinou dopoledne vleže poté, co probandi seděli v klidu po dobu 45 minut.

ECHOKARDIOGRAFIE

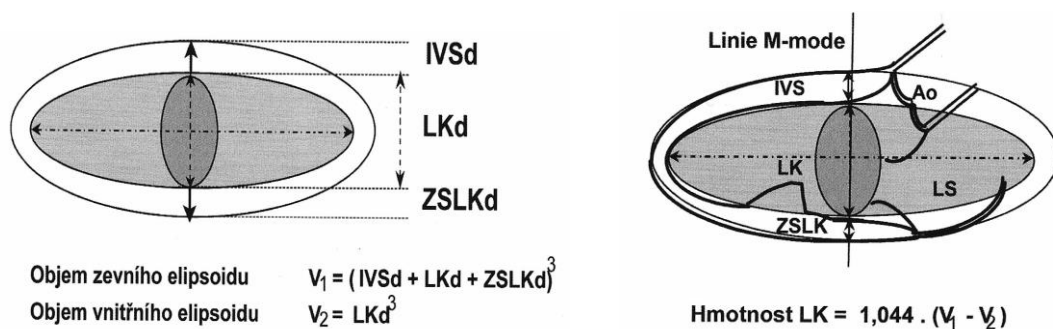
Echokardiografické vyšetření bylo prováděno dvěma zkušenými vyšetřujícími, kteří neznali výsledky analýzy genomu jednotlivých probandů. U všech subjektů byla tloušťka stěny a rozměry srdečních oddílů měřeny podle doporučení Americké společnosti pro echokardiografii v modu M. Vyhodnocovali jsme jednak šíři interventrikulárního septa IVSd, pak tloušťku zadní stěny PWD a vnitřní rozměr levé komory LVd. Rozměr levé síně byl měřen v okamžiku uzávěru aortální chlopně. Všechna měření byla provedena online a třikrát, hodnotili jsme průměr ze tří měření jednotlivých parametrů.

Masa levé komory byla kalkulována podle ASE (American Society for Echocardiography) kubického vzorce modifikovaného podle Devereux a indexována na plochu těla (BSA) Ejekční frakce levé komory (EF) byla vypočítána pomocí metody single-plane area.



Obr. 7 Schéma záznamu měření srdečních rozměrů v M modu. (podle Linhart A. a kol. *Echokardiografie pro praxi*, Praha, Audioscan, 2002, použito se souhlasem autora)

Objem svaloviny srdeční se rovná rozdílu mezi vnějším a vnitřním rotačním elipsoidem. Viz obr. 8. K výpočtu hmotnosti je objem získaný odečtením vnitřního a vnějšího elipsoidu násoben konstantou, která odpovídá hustotě (měrné hmotnosti) myokardu.



$$Hmotnost\ LK = 0,8 \cdot 1,04 \cdot [(IVSd + LKd + Zsd)^3 - Lkd^3] + 0,6\ g$$

Obr. 8. Výpočet hmotnosti levé komory srdeční podle rotačního elipsoidu. (podle Linhart a kol. Echokardiografie pro praxi Praha, Audioscan, 2002, použito se souhlasem autora)

Abychom získali korekci na tělesný habitus, použili jsme kromě hodnoty hmotnosti LK vypočtené podle výše uvedeného vzorce také hodnoty tzv. indexu hmotnosti LK, který udává korekci na tělesný povrch. $LVMI = \text{hmotnost LK} / \text{výška}^2$

STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Statistické hodnocení bylo prováděno pomocí JMP 3.2 statistického software (SAS Institute Inc. Carry, NC, USA). Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly testovány analýzou rozptylu (ANOVA – analysis of variance) a rozdíly mezi dvěma skupinami byly prováděny nepárovým Studentovým t -testem za použití Bonferoniho korekce. Jako statisticky významné výsledky byly považovány hodnoty s $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

VÝSLEDKY SOUBORU MLADÝCH NORMOTENZNÍCH MUŽŮ

POPULACE

Populace zahrnovala 113 mužů průměrného věku 26.6 ± 5.4 roky. Distribuce genotypů byla TT 23% TC 55% a CC 22%, tedy v souladu s Hardy – Weinbergovou rovnicí. Všechny 3 skupiny podle genotypu se nelišily významně ve věku, krevním tlaku, výšce, váze, tělesném povrchu ani v body mass indexu.

Polymorfismus aldosteron syntázy

	CC, n=25	TC, n=62	TT, n=26	p, ANOVA
věk	25 ± 5	27 ± 5	28 ± 6	ns
krevní tlak (mmHg)				
systolický	117 ± 11	119 ± 10	119 ± 10	ns
diastolický	79 ± 7	79 ± 8	82 ± 8	ns
výška	181 ± 7	181 ± 6	181 ± 6	ns
váha	78 ± 11	78 ± 11	79 ± 14	ns
tělesný povrch	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	ns
Body mass index (kg/m ²)	24 ± 3	24 ± 3	24 ± 4	ns

ANOVA, analýza rozptylu, ns = nesignifikantní

Tabulka 1. Obecná charakteristika studované populace podle genotypu aldosteron syntázy.

HUMORÁLNÍ PARAMETRY

Muži s TT genotypem měli signifikantně vyšší hodnoty PRA (plasmatické reninové aktivity) $2,7 \pm 1,7$ vs. $1,8 \pm 1,0$ $1,8 \pm 1,1$ ng/h $p < 0,01$ alely (TT, TC a CC). U genotypu TT jsme také pozorovali statisticky nevýznamné zvýšení plasmatických hodnot aldosteronu 113 ± 64 vs 93 ± 43 87 ± 39 pg/ml $p = 0,12$.

	CC, $n = 25$	TC, $n = 62$	TT, $n = 26$	p , ANOVA
PRA (ng/ml/h)	1.8 ± 1.1	1.8 ± 1.0	$2.7 \pm 1.7^*$	$p < 0.01^*$
Aldosteron (pg/ml)	87 ± 39.0	93.2 ± 42.7	113 ± 64.0	$p = 0.12$
Aldosteron/PRA	76 ± 73	65 ± 36	52 ± 35	ns

Tabulka 2. Srovnání hladin reninu a aldosteronu podle genotypů CYP11B2. PRA- plasmatická reninová aktivita, ANOVA – analýza rozptylu.

STRUKTURA LEVÉ KOMORY A FUNKCE

Ani v jednom měřeném parametru jsme nezaznamenali významný vztah k jednomu z genotypů aldosteron syntázy. Vnitřní rozměr levé komory, tloušťka septa i zadní stěny a celková masa levé komory i indexovaná masa levé komory na tělesný povrch byly u všech genotypů srovnatelné bez signifikantní odchylky.

Podobným způsobem byla bez rozdílu mezi jednotlivými genotypy i ejekční frakce a charakteristika transmitrálního průtoku a plnění levé komory.

VYŠŠÍ RENIN, GENOTYP TT A INDEX HMOTNOSTI LK

Pokud jsme rozdělili populaci na probandy s nižší a vyšší hladinou plasmatické reninové aktivity podle mediánu, pak osoby s vyšší plasmatickou reninovou aktivitou v přítomnosti genotypu TT měli významně vyšší index hmotnosti levé komory srdeční

Ve skupině s nižšími hladinami reninu (podle mediánu vyšetřované populace) nebyl ve vztahu k hmotnosti LK mezi jednotlivými genotypy rozdíl.

Probandi s genotypem CC ve skupině s nižší plasmatickou reninovou aktivitou měli významně nižší diastolický krevní tlak ¹¹¹.

Polymorfismu aldosteron syntázy – nízký renin

	CC, n=14	TC, n=32	TT, n=9	p, ANOVA
TKs (mmHg)	118±12	119 ± 10	123 ±11	ns
TKd (mmHg)	77 ±7	80 ±8	86 ±7	<i>p</i> < 0.05*
Septum (mm)	8.8 ± 1.7	9.2 ±1.9	9.3 ± 1.5	n
LV diam. endsyst. (mm)	54.2 ± 3.5	53.9 ± 4.5	54.4 ±3.3	ns
Zadní stěna (mm)	8.3 ± 1.2	7.9 _ 1.2	7.6 _ 0.8	ns
LV hmotnost (g)	172 ±36	172 ± 46	169 ± 27	ns
LVMI (g/m2)	86 ± 16	86 _ 20	85 ± 12	ns

Polymorfismu aldosteron syntázy – vyšší renin

	CC, n=11	TC, n=30	TT, n=17	p, ANOVA
TKs (mmHg)	116 ± 9	119 ±11	117±10	ns
TKd (mmHg)	81 ±6	78 ±8	80 ±8	ns
Septum (mm)	9.0 ± 1.8	9.1 ± 1.6	9.9 ± 1.7	ns
LK diam. endsyst. (mm)	52.9 ± 3.7	53.6±4.6	54.3±4.3	ns
Zadní stěna (mm)	7.7 ± 1.0	8.0 ± 1.2	8.7 ±1.2	ns
LV hmotnost (g)	160 ± 37	168 ± 36	191 ± 45	<i>p</i> = 0.07
LVMI (g/m2)	81 ±15	85 ± 16	95 ± 17	<i>p</i> <0.05*

*Tabulka 3. Rozdělení podle mediánu plasmatické reninové aktivity. ANOVA- analýza rozptylu; ns - nesignifikantní; LK- levá komora; LVMI - index hmotnosti levé komory; * statisticky významné pro *p* <0.05.*

Tabulky s výsledky jsou též uvedeny v originálním článku *Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men*, v **příloze č. 1** na konci textu.

VÝSLEDKY SOUBORU HYPERTONIKŮ VE SROVNÁNÍ S HYPERTONIKY REZISTENTNÍMI NA LÉČBU A ZDRAVÝMI KONTROLAMI – SOUVISLOST S GENOTYPEM CYP11B2

Dodatečně jsme stanovili polymorfismus C-344T ještě u dalších tří souborů. U normotenzních jedinců středního věku (n=156 věk 55±9 roků) u pacientů středního věku s esenciální hypertenzí s normalizovaným TK při léčbě antihypertenzivy (n=122, věk 55±9 let) a u skupiny hypertoniků rezistentních na léčbu – tedy užívajících alespoň 3 antihypertenziva, z nichž jedno bylo diuretikum (n=73, věk 57,6±8 let).

	Normotenzní kontroly	Hypertenzní pacienti n= 213		P (ANOVA)
		kontrolována léčbou	rezistentní hypertenze	
n	156	139	74	
Věk (roky)	51.3±9.7	56.6±10.5*	61.4±8.74*	p<0.001
Systolic BP (mmHg)	122±10.4	144±16.9*	152±16.1*	p<0.001
Diastolic BP (mmHg)	79.6±6.45	90.1±8.61*	95.3±8.27*	p<0.001
BMI (kg/m ²)	26.1±3.41	28.5±4.37*	6.36 ±2.27*	p<0.001
Glykemie nalačno (mmol/l)	5.29±0.73	5.98±1.74*	6.36 ±2.27*	p<0.001
Celkový cholesterol (mmol/l)	5.43±0.94	5.45±1.16	5.19±0.94	ns
Triglyceridy (mmol/l)	1.43±0.94	1.87±1.22*	1.87±0.84*	p<0.01
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.40±0.30	1.29±0.31*	1.23±0.30*	p<0.01
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.39±0.77	3.36±0.91	3.11±0.81	ns

Tabulka 4. Základní klinická charakteristika souborů podle jednotlivých parametrů. Data jsou vyjádřena jako průměry ± směrodatná odchylka, *p<0.05 pro kontrolovanou hypertenzi versus rezistentní hypertenzi versus normotenzní kontroly, jednosměrná ANOVA. BMI= body mass index.

Pokud jsme srovnali všechny hypertoniky (rezistentní i s korigovanou hypertenzí) s normotenzními kontrolami, zjistili jsme, že ve skupině hypertoniků bylo téměř 2x více nositelů alely T než ve skupině normotoniků. Rozdíl mezi skupinami v četnosti genotypů TT a frekvenci alel T byl statisticky významný na hladině $p < 0,05$ ¹¹².

skupina dle genotypu	TT	TC	CC	<i>p</i>
n	n=108	n=203	n=58	
normotonici	40	81	35	
%	37,0%	39,9%	60,3%	$P < 0,01$
hypertonici	68	122	23	$\chi^2 = 9,44$
%	63,0%	60,1%	39,7%	

Tabulka 5. Srovnání frekvencí genotypů studovaných skupin. Mezi normotoniky je výrazně častěji zastoupen genotyp CC oproti hypertonikům.

Frekvence alel (n, %)

Skupina (n)	T (n=419)	C (n=319)	<i>p</i>
normotenzní	161(38.4 %)	151 (47,3 %)	$P < 0,05$
hypertenzní	258 (61,6 %)	168 (52,7%)	$\chi^2 = 5,89$

Tabulka 6. Frekvence alel, všichni hypertenzní oproti normotenzním. Genotyp a alely jsou uvedeny jako čísla a procenta, statistická analýza pomocí χ^2 testu.

Výsledky jsou též uvedeny v originálním článku *Association of -344T/C Aldosterone Synthase Gene variant with Essential Hypertension* v **příloze č. 2** na konci textu.

DISKUSE

Potvrdili jsme spojitost mezi T-344C polymorfismem genu pro aldosteron syntázu a masou levé komory srdeční u mladých normotenzních mužů a potvrdili jsme vztah alely T a její četnosti k arteriální hypertenzi.

ASOCIAČNÍ STUDIE A KVALITA SOUBORU

Ve studii s polymorfismem genu pro aldosteron syntázu T-344C jsme hodnotili výjimečně homogenní populaci mladých a zdravých mužů kavkazského původu. Ženy jsme vyloučili z naší studie pro potenciální variabilitu hormonálních hladin během cyklu.

V asociačních studiích zabývajících se polymorfismy se často setkáváme v souborech s množstvím komorbidit a konkomitantní medikace včetně antihypertenziv (např. diuretik), které mohou zásadním způsobem ovlivnit jak hodnoty krevního tlaku, hodnoty biochemických a hormonálních parametrů i strukturální změny kardiovaskulárního aparátu. Pro relevantní výsledky je třeba buď obrovského souboru, kde se ztratí šum pozadí, nebo studium menšího, ale přísně definovaného souboru. Proto jsme považovali za zásadní vyloučit z pozorování probandy, kteří by mohli výše uvedenými faktory vnést zmatek do výsledků a jejich interpretace.

TT GENOTYP A PLASMATICKÁ HLADINA ALDOSTERONU

V naší studii jsme našli souvislost TT genotypu pro aldosteron syntázu s vyššími hladinami reninu a aldosteronu. Zvýšení hladin aldosteronu nedosahovalo statistické významnosti pro relativně velký rozptyl.

U zdravých probandů hraje systém RAAS hlavní roli v udržování extracelulárního objemu. Systémové plasmatické hladiny aldosteronu odrážejí stav hydratace resp. nálože sodíkem a vodou v organismu a mění se fyziologicky v závislosti na akutní potřebě. Pro hypertrofii myokardu jako reakci na napětí stěny, která v našem souboru navíc byla v rámci fyziologických oscilací, hraje důležitou roli lokální systém RAAS v myokardu. Ze studií s hypertonií a pacienty se srdečním selháním víme, že hladina aldosteronu v koronárním sinu a přední interventrikulární žíle může být za patologických stavů výrazně vyšší než v plasmě^{79 81}. Hlavní pool aldosteronu, který ovlivňuje případnou hypertrofii myokardu, jako reakci na napětí ve stěně, je tedy

pravděpodobně syntetizován v myokardu, kde působí jako auto a parakrinní hormon. Cirkulující aldosteron vylučovaný z nadledvin, pokud je ve fyziologickém rozmezí, se podílí hlavně na udržování extracelulárního objemu.

Renin naproti tomu je syntetizován téměř výhradně v ledvině a váže se na membránově vázaný reninový receptor, který dokonce zvyšuje jeho aktivitu ⁷⁷.

Lokální systém RAAS je tedy nejspíše závislý na systémové dodávce reninu ledvin.

TT GENOTYP A VYŠŠÍ INDEX HMOTNOSTI LEVÉ KOMORY

Po rozdělení zdravých mladých probandů podle mediánu reninu na ty s nižší a vyšší plasmatickou reninovou aktivitou, jsme zjistili mezi těmi s vyšší plasmatickou reninovou aktivitou v přítomnosti genotypu TT významně vyšší index hmotnosti levé komory srdeční. Podobný nálezn u velmi dobře selektovaného souboru nově diagnostikovaných hypertoniků bez léčby popsala i Stella a spol., kdy nositelé alely TT měli významně vyšší hmotnost levé komory srdeční při nezměněných systémových hladinách aldosteronu a vyjádřila hypotézu, že pro hypertrofii může být určující lokální systém RAAS ¹⁰⁸. Podobně našli i statisticky významnou korelaci s vyšší hmotností levé komory srdeční u homozygotů TT v metaanalýze na 2157 subjektech Sookoian a spol. ¹¹³.

Hypotetickou možností vyššího indexu hmotnosti LK u probandů s TT genotypem s vyšší PRA je potenciace efektů na myokard při aktivaci systému RAAS na více místech. Vyšší plasmatická reninová aktivita může vést k vyšším hladinám angiotensinu II, které by pak v přítomnosti určité mutace (v našem případě TT genotypu pro aldosteron syntázu) mohla vést k výraznější trofické odpovědi ve formě vyšší hmotnosti myokardu.

Steroidogenní faktor 1 (SF-1) se váže k DNA v promotorové oblasti aldosteron syntázy v místě polymorfismu k alele TT 4x slaběji než k alele C ⁸⁹, což by mohlo vysvětlit snazší možnost vazby jiných zatím neznámých transkripčních faktorů do blízkosti zmíněného polymorfismu v oblasti promotoru, protože SF-1 nereguluje přímo aktivitu aldosteron syntázy ⁸⁵.

VYŠŠÍ PLASMATICKÁ RENINOVÁ AKTIVITA A GENOTYP TT

Nejasnou je příčina statisticky významně vyšší plasmatické reninové aktivity u jedinců s TT genotypem pro aldosteron syntázu. Tento náš náález však byl potvrzen v metaanalýze Sookoiana na 5343 hypertonicích a 5882 kontrolách, kde měli homozygoti TT vyšší plasmatickou reninovou aktivitu při nezměněných hladinách plasmatického aldosteronu ¹¹⁴ spolu s o 17% vyšším rizikem nositelů TT že rozvinou arteriální hypertenzi oproti nositelům genotypu CC.

Vyšší konstitutivní sekrece reninu u těchto mladých zdravých jedinců i hypertoniků nositelů TT genotypu může být například způsobena vyšší aktivací sympatiku. Je otázkou, zda TT genotyp aldosteron syntázy může mít vliv na aktivitu sympatiku. Budeme-li hypotézovat, teoreticky to možné je – aldosteron snižuje reuptake noradrenalinu na sympatických synapsích (jak bylo popsáno výše) ¹¹⁵ a jeho vyšší koncentrace by mohla vést k větší sekreci reninu. To by zapadalo do obrazu, kde TT genotyp vede k vyšší aktivitě aldosteron syntázy, která by mohla výše uvedeným mechanismem zvyšovat sekreci reninu lokálně buď na synaptických zakončeních v ledvině nebo pozitivní zpětnou vazbou v CNS. V pokusu na myších již bylo prokázáno, že infuze inhibitoru aldosteron syntázy do cerebrospinálního moku inhibuje na sodíku závislou hypertenzi a blokuje sympatickou hyperreaktivitu směrem k ledvině ¹¹⁶. Podobně intracerebrovenrikulární aplikace inhibitoru mineralokortikoidního receptoru u krys snižuje systémové hladiny noradrenalinu, sympatickou aktivitu a krevní tlak ¹¹⁷.

Genotyp TT by však také mohl být například markerem pro jinou zatím neznámou genetickou změnu, která může mít přímý vliv na sekreci reninu.

TT GENOTYP A ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE

Na souboru hypertoniků a normotenzních kontrol středního věku jsme potvrdili asociaci TT genotypu s arteriální hypertenzí. Četnost alely T byla u hypertoniků statisticky významně - téměř dvakrát vyšší než u normotenzních kontrol.

Krevní tlak je výslednicí několika proměnných. Zásadním faktorem kromě periferní rezistence a srdečního výdeje dlouhodobě určujícím krevní tlak je intravaskulární objem neboli balance vody a natria. U všech doposud identifikovaných monogenních

forem těžké hypertenze bylo přímo ovlivněno množství natria vylučovaného z organismu. Za normálních podmínek je intravaskulární objem korigován tlakovou natriurézou. Čím je vyšší krevní tlak, tím je vyšší natriuréza, dokud nedojde k ustavení rovnováhy. Opačně při nižším tlaku dochází k retenci sodíku a vody dokud není opět dosaženo optimálního krevního tlaku.

Udržování homeostázy tekutin je možná fylogeneticky důležitější a pravděpodobně starší než udržování krevního tlaku. Například v pouštních podmínkách bylo klíčové rozvinout schopnost retinovat vzácnou vodu a sodík. Toto nastavení může být nyní v době obecně přesolené stravy nevýhodou analogicky, jako jsou dnes nevýhodné prokoagulační mutace, které vedou k vyšším výskytům tromboembolické nemoci při snížené mobilitě. Tyto mutace, které mírně posunuly rovnováhu koagulace na stranu koagula umožnily předkům nevykrváct v boji o přežití, dnes působí nevýhodně.

Systém renin angiotensin aldosteron ovlivňuje jak napětí cévní stěny, tak hospodaření s tekutinami (zátěž sodíkem a vodou), navíc přímo působí na buňky některých cílových orgánů.

Z tohoto důvodu jsme v rámci výzkumného záměru polymorfismu kandidátních genů při studiu arteriální hypertenze našem pracovišti hodnotili polymorfismy dalších kandidátních genů ze systému RAAS. Jmenovitě polymorfismus genu pro angiotensinogen M235T a inserčně / deleční polymorfismus genu angiotensin konvertujícího enzymu – ACE (I/D) ve vztahu k hypertrofii levé komory srdeční na skupině mladých normotenzních mužů. Zde jsme však nenašli žádné korelace s krevním tlakem ani s funkcí ani hmotností levé komory srdeční¹¹⁸. U polymorfismu pro aldosteron syntázu jsme však vztah k hypertenzi a hypertrofii levé komory srdeční našli. Náš náález je ve shodě s recentně publikovanými pracemi, které potvrzují klíčové postavení aldosteronu v systému renin angiotensin aldosteron⁶².

CYP11B2 U PRIMÁRNÍHO ALDOSTERONISMU

V práci Jáchymové a Widimského na pacientech s primárním aldosteronismem (PA), kteří se sestávali ze dvou skupin jednak aldosteron produkujícího adenomu APA n=24 a idiopatického hyperaldosteronismu IHA n=26 ve srovnání s pacienty s esenciální hypertenzí a normotenzními kontrolami, byla nalezena i přes relativně malý počet osob s hyperaldosteronismem, velmi výrazná korelace TT genotypu a

frekvence T alel s idiopatickým hyperaldosteronismem (IHA) ve srovnání s normotenzními kontrolami $p < 0,01$ i ve srovnání s aldosteron produkujícím adenomem $p < 0,01$ ¹¹⁹. Uvedené nálezy by mohly svědčit pro roli polymorfismu aldosteron syntázy v její regulaci při vzniku idiopatického hyperaldosteronismu. Lze však předpokládat další důležitý spouštěč, který vede k zásadně zvýšeným hodnotám plasmatického aldosteronu v přítomnosti TT genotypu pro aldosteron syntázu.

Podobně prokázali Lim a spol. asociaci alely T ve vztahu k výši plasmatického poměru aldosteron/renin (ARR – aldosterone renin ratio) na souboru pacientů s hyperaldosteronismem a výrazně vysokým ARR. Tato asociace byla zvýrazněna, pokud byla přítomna i mutace v intronu 2 typu converse. S nejvýraznější korelací pro genotyp SF-1 TT a I2 CC ¹²⁰.

LIMITACE TRANSVERSÁLNÍ STUDIE

Studiem populace zdravých dobrovolníků nebo kohorty pacientů s rezistentní hypertenzí můžeme získat vztahy několika veličin - typu genomu, intermediárního fenotypu a krevního tlaku. Nemáme však možnost zjistit, jaká by byla reakce na fyziologický podnět v závislosti na daném genomu. Podobná studie byla provedena na 1200 britských vojenských rekrutech, kteří byli podrobena výcviku. Po 10 týdnech byla sledována odpověď organismu – nárůst masy levé komory srdeční hodnocené magnetickou rezonancí. Probandi s DD genotypem pro angiotensin konvertující enzym (ACE) měli 3 krát větší nárůst masy levé komory srdeční než jedinci s II genotypem ¹²¹.

Jiným zátěžovým testem byla nálož sodíku podávaná probandům ve studii na německých a finských dobrovolnících, kdy jedinci s alelou -344C pro aldosteron syntázu měli větší citlivost pro nárůst masy levé komory (LK) srdeční a zvětšení enddiastolického rozměru LK po podání diety s vysokým obsahem soli ¹⁰⁶.

V našich podmínkách jsme neměli možnost provést „zátěžový test“ u našich probandů. Sledovali jsme parametry za stabilních podmínek, avšak na vysoce homogenním souboru.

Jistě zajímavým parametrem by bylo stanovení hladin angiotensinu II a vztah jeho hladin k naměřeným hodnotám plasmatické reninové aktivity i plasmatických

koncentrací aldosteronu a krevního tlaku. Stanovení plasmatických hladin angiotensinu II je však náročné na zpracování a v našich podmínkách nebylo proveditelné.

Další obecnou limitací všech humánních studií a systému RAAS je obtížné měření lokálních koncentrací jednotlivých hormonů a klíčových enzymů v situaci, kdy lokální RAAS hraje rozhodující roli, jak je tomu pravděpodobně při reakci myokardu na zvýšené napětí ve stěně.

SHRNUTÍ DISKUSE

V naší studii jsme prokázali vztah mezi TT genotypem aldosteron syntázy, hypertrofií LK a zjistili jsme, že pacienti s TT genotypem mají vyšší plasmatickou reninovou aktivitu. Také jsme potvrdili asociaci alely T s arteriální hypertenzí v české populaci. V budoucnu by bylo přínosné zjistit, jakým patofyziologickým mechanismem dochází k vyššímu uvolňování reninu u nositelů alely TT pro aldosteron syntázu a jestli a jakým přesným mechanismem T alela přispívá k vyšší transkripci aldosteron syntázy.

Na základě našich výsledků a zdrojů v písemnictví můžeme vypožorovat dva intermediární fenotypy:

1. TT genotyp a vyšší PRA se sklonem k hypertenzi a hypertrofii LK (která je pravděpodobně zprostředkována také přes AT1R¹⁰⁵) s adekvátním poklesem plasmatického aldosteronu po zátěži solí a adekvátním zvýšením exkrece sodíku močí po zátěži solí.
2. CC genotyp s relativně větším enddiastolickým rozměrem LK a sníženou exkrecí soli po zátěži a plasmatickými hladinami aldosteronu, které adekvátně neklesají po zátěži solí¹⁰⁷.

Práce studující vliv běžného polymorfismu v populaci mohou mít potenciální praktické využití ve farmakoterapii. Pokud by se prokázalo významné působení určitého polymorfismu v systému tak důležitém pro srdeční selhání a arteriální hypertenzi a selhání ledvin, jakým bezesporu systém RAAS je, pak by bylo možno v souvislosti s léčbou stratifikovat pacienty např. se srdečním selháním nebo s hypertenzí a hypertrofií srdce k včasnější a případně intenzivnější léčbě nebo léčbě specifické podle genetické zátěže toho či kterého jedince.

Aldosteron se stal středem výzkumu kardiovaskulárních hormonálních regulací posledních let. Z recentních prací na tomto poli vyplývá, že to, co bylo považováno za efekt angiotensinu II, je z velké části závislé na aktivovaném mineralokortikoidním receptoru minimálně z určité části lokálně produkovaným aldosteronem. Toto tvrzení podporují nálezy, kdy aditivní blokáda systému RAAS na úrovni aldosteronu přináší zjevný klinický užitek u pacientů se srdečním a renálním selháním.

ZÁVĚR

Systém renin angiotensin aldosteron se dotýká dvou ze tří hlavních proměnných v regulaci krevního tlaku. Jednak jeho efektor angiotensin II je mocným vasokonstriktorem a aldosteron nastavuje úroveň intravaskulárního objemu řízením vstřebávání sodíku a vody. Aldosteron je jedním z nepotentnějších růstových faktorů pro vznik hypertrofie a fibrózy myokardu a cévní stěny. Navíc jeho blokáda příznivě působí na morbiditu i mortalitu u pacientů s hypertenzí, aterosklerózou a srdečním selháním a selháním ledvin.

ČÁST 2. SUBKLINICKÉ ZMĚNY U ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE NA ÚROVNI CÉVNÍ STĚNY A FORMOVANÝCH ELEMENTŮ

CIRKULUJÍCÍ CYTOADHESIVNÍ MOLEKULY A MARKERY ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE U NEKOMPLIKOVANÉ ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE A EFEKT LÉČBY INHIBITORY ANGIOTENSIN KONVERTUJÍCÍHO ENZYMU.

Působením vysokého krevního tlaku dochází v malých a velkých tepnách postupně ke změnám, které způsobují závažné kardiovaskulární komplikace. Prvním stadiem jsou změny na mikroskopické a celulární úrovni vnitřní výstelky cév, endotelu, který svou velikostí tvoří jeden z největších orgánů v lidském těle ¹.

HEMODYNAMICKÉ SÍLY PŮSOBÍCÍ NA ENDOTEL

Endotel je kromě výše uvedených humorálních vlivů vystaven dvěma hemodynamickým silám, které působí na jejich povrch a na vazby mezi nimi. První silou je transmurní tlakový gradient a druhou smykové napětí vytvářené proudící krví o cévní stěnu. V krevním řečišti jsou tyto síly variabilní v závislosti na typu pulsatility toku a na jeho rychlosti a velikosti cévy. Pulsatlní napětí v cévní stěně je přenášeno na cytoskelet endotelií v místech mezibuněčných spojů a v místech ukotvení cytoskeletu do okolní matrix pomocí transmembránových bílkovin ¹²². Smykové napětí (shear stress), napětí z tření, je určováno rychlostí toku, viskozitou a rozměry cévy. Čím vyšší je viskozita nebo drobnější průsvit cévy, tím vyšší je smykové napětí, které působí na cytoskelet endotelií. V praxi je nejvyšší smykové napětí v malých arteriolách. Ačkoliv jsou obě výše uvedené síly nezávislé, obě dohromady působí napětí na jednom cytoskeletu endoteliální buňky. Smykovému napětí jsou vystaveny pouze endotelie, kdežto ostatní buňky cévní stěny jako např. buňky hladkého svalstva jsou vystaveny pouze transmurnímu tlakovému gradientu.

Přesný mechanismus přenosu informace o napětí na chemickou úroveň uvnitř buňky zatím není zcela znám ¹²³. Předpokládá se napojení cytoskeletu zvláště integrinů na iontové kanály, které jsou vázané na mechanické napětí. V pokusu vystavení endotelií smykovému napětí vede k aktivaci draslíkových a vápníkových kanálů ¹²⁴, které pak vedou k další mobilizaci intracelulárního vápníku a aktivaci kináz, které

působí jednak adaptaci cytoskeletu, ale také expresi mnoha genů jako např. endoteliální NO syntázy, tkáňového faktoru a cytoadhesivních molekul ¹²⁵.

Nezávisle na etiologii hypertenze dochází vlivem výše popsaných sil v kombinaci s neurohumorálními změnami, které mohou být jak systémové, tak lokální, v tepnách postupně k zánětlivým změnám, typicky ve třech stádiích. Nejprve se zvyšuje vaskulární permeabilita (1), poté dochází k průniku leukocytů a k aktivaci tkáňových reparačních procesů (2), které vedou ke vzniku (3) aterosklerotického plátu a / nebo difusní arterioskleróze charakterizované zesílenou intimou s depozity extracelulární matrix, atrofickou medií a elongací tepen. Systém renin angiotensin aldosteron ovlivňuje všechny tyto procesy ¹²⁶.

ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE JAKO ČASNÝ MARKER POSTIŽENÍ CÉV

Endoteliální dysfunkce je charakterizována jako souhrn různých abnormalit funkce endotelu z fyziologických mezí. Jednou z nejznámějších je omezená vazorelaxace zprostředkovaná endotelem, kterou lze celkem snadno prokázat i neinvazivně. Spočívá v nedostatečné schopnosti endotelu produkovat NO (oxid dusnatý) neboli dříve, před identifikací známý pod názvem EDRF (endothelium derived relaxing factor) ^{127 128}.

Jedním z klíčových okamžiků rozvoje aterosklerózy z klinicky němé arteriální hypertenze je průnik formovaných elementů z lumina cévy do subendoteliálního prostoru. Tento přestup je umožněn právě díky cytoadhesivním molekulám ¹²⁹.

Proto jsme se soustředili na cytoadhesivní molekuly resp. hladiny solubilních cirkulujících cytoadhesivních molekul v krvi jako markeru endoteliální dysfunkce ⁴.

ZÁKLADNÍ TYPY CYTOADHESIVNÍCH MOLEKUL

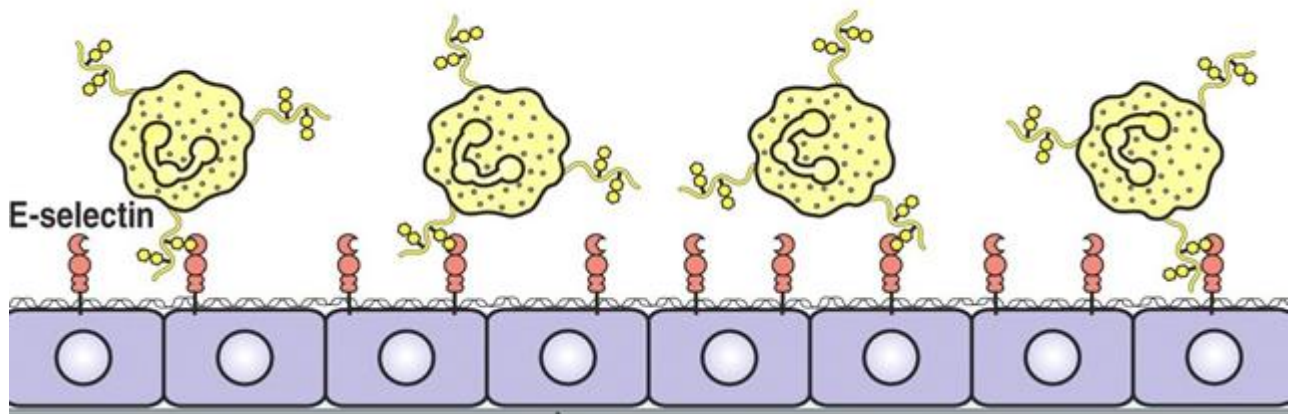
Cytoadhesivní molekuly jsou relativně velké glykoproteiny s hmotností mezi 95 a 140 kD. Jsou tvořeny extracelulární doménou, krátkou hydrofobní doménou procházející cytoplasmatickou membránou a cytoplasmatickou doménou. Lze je rozdělit do čtyř tříd. Integriny, imunoglobulinovou skupinu, kadheriny a selektiny.

Integriny jsou exprimovány na povrchu leukocytů, zprostředkovávají adhezi k extracelulární matrix, podílejí se na zachování integrity buněk vazbou k cytoskeletu a vytvářejí mezibuněčná spojení. (VLA skupina - very late antigen – dimer; LFA (lymphocyte fuction associated antigen) skupina, glykoprotein IIb/IIIa). Na integriny se váže cytoskelet ve formě mikrotubulů a mikrofilament. Integriny s přilehlými proteiny jsou zdrojem mechanotransdukce. V reakci na shear stres a pulsatilní napětí spolu s asociovanými proteiny zprostředkovávají signalizaci a buněčnou odpověď která vede k expresi odpovídajících proteinů, receptorů a enzymů ¹³⁰.

Imunoglobulinová skupina je exprimována na endoteliálních buňkách, leukocytech a epiteliálních buňkách. Zástupci jsou ICAM 1-3 (intercellular adhesion molecule), VCAM -1 (vascular cell adhesion molecule -1) a PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule). Zajišťují pevnou adhezi a transendoteliální migraci leukocytů.

Kadheriny zprostředkovávají adhezi mezi přilehlými buňkami a vytvářejí struktury podobné zipu v místech mezibuněčných spojení epiteliálních buněk. Také se účastní asociace buněk při vzniku tkání při embryonálním vývoji. Rozlišují se tři druhy kadherinů podle exprese v různých tkáních na N – kadherin exprimovaný v nervové tkáni, P- placentární a E- epiteliální ¹³⁰.

Selektiny zprostředkovávají slabou vazbu mezi endotelem, leukocyty a krevními destičkami před pevnou adhezí, která je posléze zajištěna integriny. Názvy E, P, L selektin se odvíjejí od toho, kde byly poprvé popsány. E- selektin je exprimován na povrchu endotelií působením cytokínů. L -selektin (leukocytární) je exprimován na leukocytech a P- selektin jednak v α - granulích destiček, ale i ve Weibel-Paladeho tělíscích endoteliálních buněk. Díky relativně slabé vazbě selektinů může docházet při pomalému rolování leukocytů po stěně endotelu k dalším interakcím, zvláště pevné vazbě a průniku leukocytu subendoteliálně do místa zánětu ¹³¹.



Obr. 9. Schéma rolujícího leukocyty po povrchu endotelu a adheze pomocí selektinu. E selectin se váže na Sialyl Lewis x (sLex)-like glykany, které jsou běžně exprimovány na cirkulujících leukocytech.

Interakce cirkulujících leukocytů s endotelem probíhá ve třech krocích.

1. Rolování
2. Pevná adheze
3. Transendoteliální migrace

První fázi rolování zprostředkovávají nepříliš pevné vazby molekul E selectinu a P selectinu s povrchem endotelu. Během rolování dochází ke konformačním změnám integrinů, které umožní pevnou adhezi leukocytů ¹³².

Pevná vazba je pak zajištěna interakcí integrinů leukocytů (VLA-4 a LFA-1) s imunoglobulinovými adhezivními molekulami endoteliálních buněk (VCAM-1 a ICAM-1). Diapedéza a transendoteliální migrace monocytů je závislá na aktivaci imunoglobulinové molekuly PECAM-1 (neboli CD 31) v intercelulárních spojeních a na působení chemotaktických podnětů z místa zánětu zvláště na MCP-1 proteinu (monocyte chemotactic protein) ^{133 134}.

Pro studium endoteliální dysfunkce pomocí solubilních cytoadhesivních molekul jsou vhodné hlavně glykoproteiny ze skupiny selectinů (E-selectin a P selectin) a ze skupiny imunoglobulinů ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1), ¹³⁵ které jsou při dysfunkci endotelu exprimovány na povrchu endotelií ve výrazně vyšším množství než za fyziologického stavu ^{4, 136}.

HORMONÁLNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FUNKCI ENDOTELU

NO – oxid dusnatý je důležitý v regulaci bazálního cévního tonu a vazodilatace (při fyzické zátěži) za fyziologických i patologických situací např. při zánětu. NO je krátkodobě působící lipofilní plyn, který je syntetizován v endoteliálních buňkách NO syntázou z L-argininu. NO syntáza se v lidském organismu vyskytuje ve třech isoformách. Konstitutivní (ecNOS) syntáza v endoteliích, inducibilní NO syntáza – (iNOS) která je exprimována na makrofázích a dalších buňkách působením cytokinů nebo endotoxinů. nNOS je neuronální NO syntáza, která je přítomna v neuronech centrálního i periferního nervového systému.

Pro funkci endotelu je klíčová konstitutivní ecNOS, jejíž aktivita je stimulována fyzikálními faktory jako např. zvýšeným smykovým napětím (shear stress) při zvýšení průtoku, hypoxií a řadou tkáňových působků (acetylcholinem, bradykininem, substancí P, ADP, angiotensinem II, endothelinem-1). Některé z těchto působků jsou vyloženě vasokonstriktory a stimulace ecNOS může být regulačním mechanismem zpětné vazby.

Konstitutivní ecNOS je inhibována arteriální hypertenzí, oxidativním stresem a všemi pochody, které k němu vedou např. kouřením, vysokou hladinou aterogenních lipidů i vlastním aterogenním postižením ^{127, 137}.

Bradykinin je nonapeptid s výraznými vasodilatačními účinky. Váže se na bradykininové B₂ receptory, které zprostředkovávají přímý vasodilatační efekt a pak působí aktivaci NO syntázy a produkci NO a EDHF (Endothelium derived hyperpolarizing factor), který také zprostředkovává vazodilataci. Bradykinin má další účinky jako např. inhibuje agregaci a adhezi destiček, brání proliferaci hladkých svalových buněk a adhezi leukocytů. Bradykinin také zvyšuje sekreci tkáňového aktivátoru plasminogenu (t-PA) z endotelií, čímž aktivuje fibrinolytický systém. ¹³⁸

Bradykinin je deaktivován enzymem kininázou II, která se také nazývá ACE neboli angiotensin konvertující enzym. Inhibitory ACE tedy kromě snížení produkce angiotensinu II a potažmo aldosteronu působí i snížené odbourávání bradykininu, což může potencovat jejich vasodilatační antiproliferativní a antitrombogenní efekt.

Prostacyklin (PGI₂) je vasodilatačně působící prostanoid, přirozený antagonist destičkového tromboxanu A₂. Při jeho tvorbě hraje roli enzym cyklooxygenáza a prostacyklin syntáza. Tvorba prostacyklinu je aktivována změnami smykového napětí (shear stress) a humorálními faktory obdobnými jako syntéza oxidu dusnatého (NO). Prostacyklin působí aditivně k účinku NO a tlumí aktivaci a agregaci krevních destiček způsobenou tromboxanem A₂. Působí jako parakrinní vasodilatační hormon. Jeho vasodilatační aktivita je ve srovnání s NO nižší. ¹³⁹

Endotelin-1 (ET-1) je peptid tvořený 21 aminokyselinami. Je tvořen v endoteliích z big endothelinu a preproendothelinu působením endotelin konvertujícího enzymu. Endotelin-1 má parakrinní a autokrinní účinky, které jsou zprostředkovávány přes receptory ET_A, ET_{B1}, a ET_{B2}. Většina kardiovaskulárních efektů endothelinu-1 je zprostředkována skrze receptory ET_A. ET_A receptor zprostředkovává vasokonstrikci, ET ¹³². Aktivace ET_{B1} receptoru vede k produkci oxidu dusnatého NO a k natriuréze. ET_{B2} receptor působí vasokonstrikci ¹⁴⁰.

Za fyziologických podmínek působí endotelin bimodálně. Nejprve dochází ke krátké vasodilataci, která je následována dlouhotrvající konstrikcí. Vasodilatace je zprostředkována působením endothelinu na ET_{B1} receptor. Účinek endothelinu tak může být v různých řečištích jiný podle exprese druhů jeho receptorů. ^{141, 142}

Při chronickém poškození endotelu se objevuje plně vasokonstrikční účinek. Endotelin hraje důležitou roli v plicní cirkulaci, kde se podílí významným způsobem na plicní hypertenzi ¹⁴³.

Endotelin má úzký vztah k systému RAAS. Angiotensin II zvyšuje transkripci endothelinu působením na AT₁receptory přes aktivaci fosfolipázy C a proteinkinázy C.

Opačným směrem endotelin působí na systém RAAS. ET-1 snižuje sekreci reninu v juxtaglomerulárních buňkách jak in vitro, tak in vivo, čímž tvoří důležitý mechanismus zpětné vazby.

V nadledvině v zona glomerulosa endotelin zvyšuje transkripci aldosteron syntázy a v experimentu na zvířeti i zvyšuje syntézu DNA a proliferaci buněk nadledviny ⁸⁷.

Angiotensin II má přímý a nepřímý vasokonstrikční vliv. Má proliferativní účinky na hladký sval a za určitých okolností může působit i apoptózu svalových buněk cévní stěny. Nepřímo působí tím, že stimuluje tvorbu endotelinu -1, který je výrazným vasokonstriktorem. Dále tlumí fibrinolýzu tím, že zvyšuje produkci inhibitoru aktivátoru plasminogenu (PAI-1). Aktivací lokální syntézy aldosteronu se podílí na zvýšení fibroprodukce a progresu zánětu.

Angiotensin II aktivuje nikotinamid-adenin–dinukleotid (NADPH) oxidázy v buňkách hladkých svalů, monocytů, makrofágů a endoteliálních buňkách, které produkují kyslíkové radikály. Ty pak vedou k aktivaci prozánětlivých transkripčních faktorů NF κ B (nukleárního faktoru kappa B) a proteinového aktivátoru-1. NF κ B pak indukuje produkci adhesivních molekul, chemokínů jako např. monocytového chemoatraktantového proteinu (MCP -1) a zánětlivých cytokínů ¹⁴⁴.

Recruitment monocytů a makrofágů může zvyšovat aktivitu lokálního systému RAAS, protože makrofágy exprimují ACE, AT $_1$ R a částečně renin respektive receptor pro renin. Zvýšení aktivity místního RAAS pak zvýší migraci dalších makrofágů do cévní stěny skrze expresi cytoadhesivních molekul a cytokínů. ¹⁴⁵

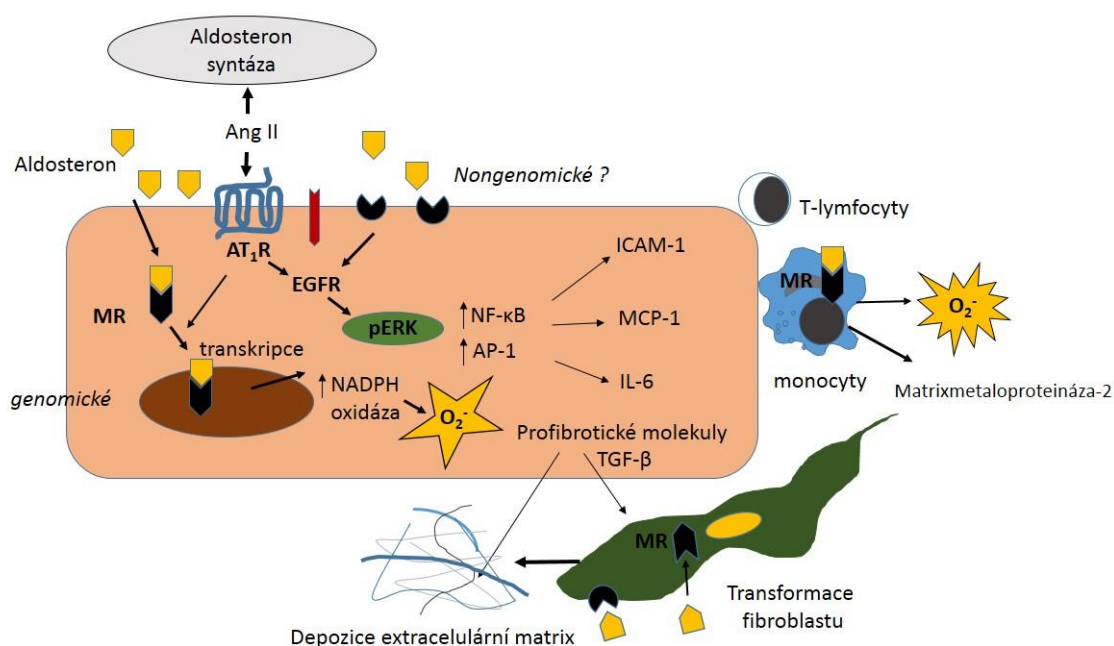
V experimentu na myši 14 denní infuze angiotensinu II vyvolala infiltraci aortální stěny, i periaortální tkáně, produkci superoxidu, endoteliální dysfunkci a hypertenzi.

Myši, které neměly T a B lymfocyty byly chráněny proti vzniku endoteliální dysfunkce a hypertenzi. Hypertenzi také inhiboval inhibitor tumor necrosis faktoru– α (TNF- α). Opětovné přidání T lymfocytů vedlo k obnovení hypertenzní odpovědi ¹⁴⁶. Tento náález svědčí pro nově popsanou roli T lymfocytů v hypertenzi indukované angiotensinem II.

Aldosteron má profibrotický, prozánětlivý a proliferační účinek na cévní stěnu – indukuje endoteliální dysfunkci a perivaskulární a intersticiální fibrózu. Aldosteronem indukovaná vaskulopatie byla popsána již u primárního aldosteronismu ³⁶. Aldosteron může být syntetizován přímo lokálně v cévní stěně stimulací AT $_1$ R pro angiotensin II. Aldosteron působí lokální zánět tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů tím, že zvyšuje expresi NADPH oxidázy v monocytů. Dále inhibuje NO syntázu tím, že oxiduje její kofaktor, čímž prohlubuje endoteliální dysfunkci ¹⁴⁷.

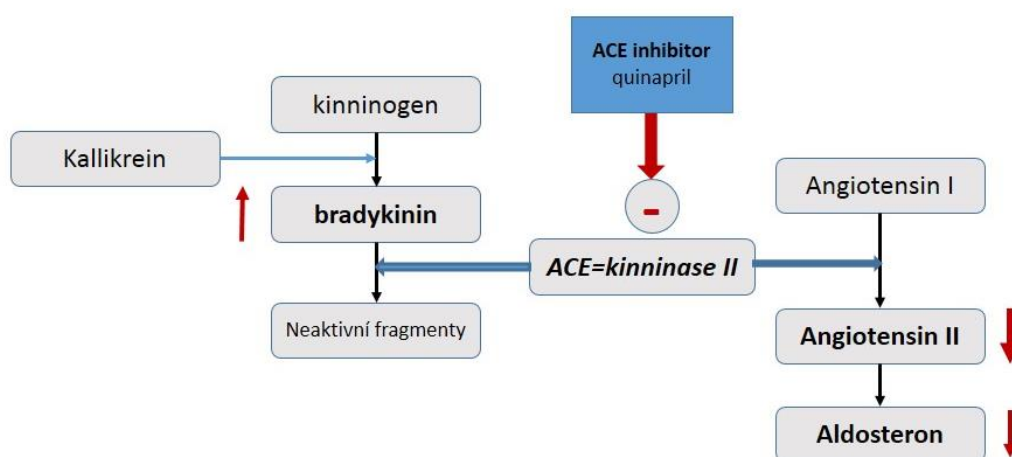
Aktivovaný mineralokortikoidní receptor s navázaným aldosteronem interaguje s působením angiotensinu II na AT₁R a aldosteron zvyšuje prozánětlivý efekt angiotensinu II. Aldosteron působí i nengenomicky, v této cestě je zahrnut receptor GPR30 a receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a rychlá fosforylace extracelulárním signálem regulovaných kináz 1 a 2 (ERK1/2)^{148, 31}.

Souhrnem aktivace systém renin angiotensin aldosteron přispívá k oxidativnímu stresu a zánětu v cévní stěně ¹⁴⁹.



Obr. 10. Schéma působení aldosteronu na vaskulární fibrózu. Aldosteron působí na MR – genomicky, kde působí aktivaci prozánětlivých genů. Také působí rychlé, na transkripci nezávislé efekty – nengenomické působení. Aldosteron aktivuje NADPH oxidázy, které působí produkci kyslíkových radikálů. Ang II zvyšuje na MR závislou transkripci působením na AT₁ receptor. Aldosteron a Ang II fosforyluje ERK1/2 (extracelulárním signálem regulované kinázy) skrze genomické i non genomické působení. Nengenomické působení zahrnuje transaktivaci EGFR (epidermal growth factor receptor – receptor pro epidermální růstový faktor). Zvýšení oxidativního stresu a aktivace ERK má za následek expresi prozánětlivých transkripčních faktorů, adhesivních molekul – např. ICAM-1 a chemokinů, které atrahují monocytů jako MCP-1. Leukocyty secernují IL-6, který zvyšuje expresi profibrotických faktorů jako TGF-β (transforming growth factor beta transformující růstový faktor beta) a PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor aktivátoru plasminogenu). (přepřacováno podle Nancy J. Brown, Hypertension 2008 ¹⁴⁹)

V předchozích studiích bylo prokázáno, že množství cirkulujících solubilních cytoadhesivních molekul koreluje přímo s množstvím exprimovaných ICAM-1 a E-selektinu na povrchu endoteliálních buněk ¹⁵⁰. Dále bylo demonstrováno, že pacienti s diabetem mellitem a esenciální hypertenzí mají vyšší hodnoty solubilních cytoadhesivních molekul ICAM -1 a VCAM-1, E selectinu a von Willebrandova faktoru (vWf) ¹⁵¹. Vyšší hladiny solubilního P selektinu byly nalezeny v korelaci s vyšším rizikem budoucího infarktu myokardu a kardiovaskulárního úmrtí ¹⁵². Dále pak byly nalezeny výrazně vysoké hodnoty solubilních cytoadhesivních molekul u pacientů s renovaskulární a maligní hypertenzí ¹⁵³. Tito pacienti jsou charakterizováni právě výraznou aktivací systému renin- angiotensin-aldosteron.



Obr. 11. Schéma působení inhibitoru ACE. Inhibicí ACE dochází k poklesu hladin angiotensin II a aldosteronu, naopak stoupá hladina bradykininu.

Systém renin angiotensin aldosteron působí prohloubení endoteliální dysfunkce u pacientů s arteriální hypertenzí ^{154 155}. Terapeutické ovlivnění tohoto systému inhibítorem konvertujícího enzymu ACE snižuje oxidativní stres a hladiny solubilních cytoadhesivních molekul, které mohou být vhodným markerem endoteliálního poškození, jak bylo popsáno v některých pilotních studiích např. u hypertoniků s mikroalbuminurií ¹⁵⁶.

HYPOTÉZA

1. Pacienti s nekomplikovanou hypertenzí bez jakýchkoli klinických známek aterosklerózy již mají molekulární subklinické známky poškození endotelu ve smyslu změněných hladin cytoadhesivních molekul a vasoaktivních působků jako např. endotelinu-1 oproti srovnatelným zdravým kontrolám.
2. V poškození cévní stěny již v takto časných stádiích esenciální hypertenze předpokládáme klíčovou roli systému renin angiotensin aldosteron, proto předpokládáme, že inhibice tohoto systému inhibitory konvertujícího enzymu u pacientů s nekomplikovanou esenciální hypertenzí způsobí detekovatelné změny v hladinách markerů endoteliální dysfunkce – cytoadhesivních molekul a vasoaktivních působků.

CÍL PRÁCE

Cílem studie bylo zjistit, zda pacienti s nekomplikovanou esenciální hypertenzí budou mít vyšší hodnoty solubilních cytoadhesivních molekul, případně von Willebrandova faktoru (vWf) a endotelinu-1 ve srovnání se zdravými kontrolami.

Dále jsme studovali efekt léčby inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) quinapriem na markery endotheliální dysfunkce. Očekávali jsme, že tříměsíční léčba inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu může mít příznivý vliv na hladinu cytoadhesivních molekul a případně na další změny v koagulačních a humorálních parametrech.

METODY

STUDOVANÁ POPULACE

Během zkoumání jsme porovnávali hladiny cytoadhesivních molekul u hypertoniků středního věku 50 ± 10 let $n=22$, s mírnou esenciální hypertenzí (systolickým krevním tlakem 143 ± 18 mm Hg a diastolickým 94 ± 5 mm Hg), kteří měli srovnatelné ostatní parametry jako krevní tlak, hladiny sérového cholesterolu, BMI atd.

Z našeho souboru jsme vyloučili diabetiky, pacienty s vysokou hladinou cholesterolu, renální insuficiencí, a jakoukoli manifestní formou aterosklerózy, která by mohla mít zásadní vliv na hladiny cirkulujících cytoadhesivních molekul. Probandi nesměli mít jiné závažné onemocnění ani závažnou alergii nebo recentní infekční onemocnění.

Všichni studovaní pacienti byli podrobně vyšetřeni, byl jim změřen krevní tlak podle doporučení WHO -ISH a měli provedena screeningová laboratorní vyšetření. Všichni pacienti měli vysazenu na 3 týdny antihypertenzní léčbu (wash out period) a byla provedena laboratorní vyšetření za standardizovaných podmínek včetně odběru vzorků ke stanovení množství solubilních cytoadhesivních molekul.

Kontrolní skupinu tvořilo 29 zdravých mužů odpovídajícího věku jako ve skupině hypertoniků, kteří měli srovnatelné antropometrické a základní biochemické parametry, studie byla schválena etickou komisí a všichni účastníci podepsali informovaný souhlas ¹⁵⁷.

LABORATORNÍ METODY:

Všem pacientům byly odebrány vzorky krve ráno nalačno poté, co leželi 20 minut v klidu na zádech. Vyšetřovali jsme standardní parametry (sedimentace erytrocytů, biochemické vyšetření séra, krevní obraz, lipoproteinové spektrum, hemokoagulační parametry a CRP). Hladiny solubilních cytoadhesivních molekul byly stanoveny pomocí komerčních kitů používajících metodu ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) firmy RD Systems, Abingdon, UK. Monoklonální protilátky byly specifické pro E-selectin, P-selectin a ICAM-1. Hladina von Willebrandova faktoru byla měřena komerčním ELISA kitem s použitím specifického králičí protilátky (Asserachrom, Diagnostica Stago, Francie). Hladiny plasmatického endothelinu jsme měřili komerční radioimmunoesejí (firmy DRG – Instruments GmbH, Marburg, Německo).

Statistické zpracování bylo provedeno statistikem pomocí JMP 3.2.2 software. Srovnání mezi pacienty a zdravými kontrolami bylo prováděno Studentovým t-testem. Test Mann-Whitney byl použit k porovnání hladin PAI (Plasminogen activator inhibitor). Změny v hladinách solubilních cytoadhesivních molekul před léčbou a po léčbě byly porovnány párovým Studentovým t-testem. PAI hodnoty byly hodnoceny Wilcoxonovým testem. Hodnoty pro $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Pacienti, kteří již byli léčeni před zahájením studie, vysadili antihypertenzní léčbu na 3 týdny a poté byly teprve provedeny bazální odběry sledovaných parametrů. Nově diagnostikovaní hypertonici byli vyšetřeni rovnou. Po odběru sledovaných parametrů byl nemocným nasazen quinapril v dávce 5-40 mg/den titrované dle krevního tlaku. Průměrná dávka qinaprilu byla $13,2 \text{ mg} \pm 8,3 \text{ mg}$. Průměrný systolický krevní tlak klesl při léčbě quinaprilem ze 143 ± 15 na $137 \pm 15 \text{ mm Hg}$. Diastolický tlak poklesl z 94 ± 8 na $88 \pm 9 \text{ mm Hg}$.

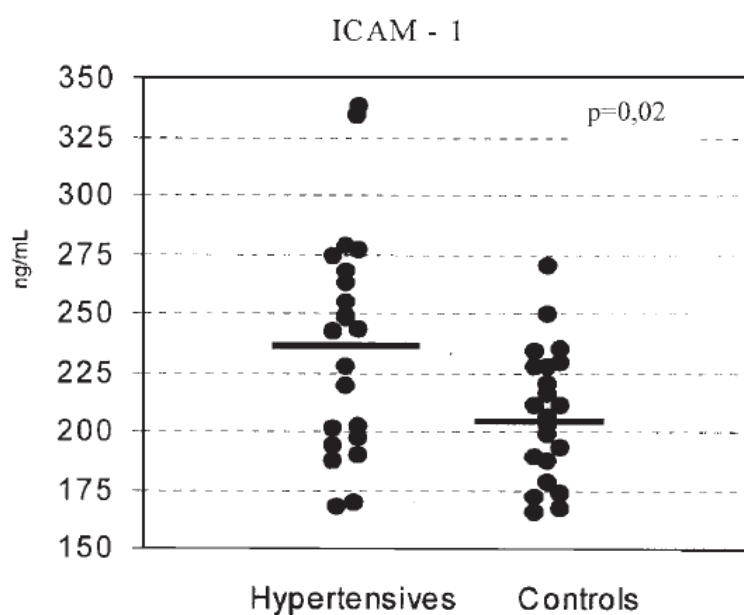
VÝSLEDKY

Oba studované soubory měly kromě hodnot krevního tlaku srovnatelné základní antropomorické a biochemické parametry.

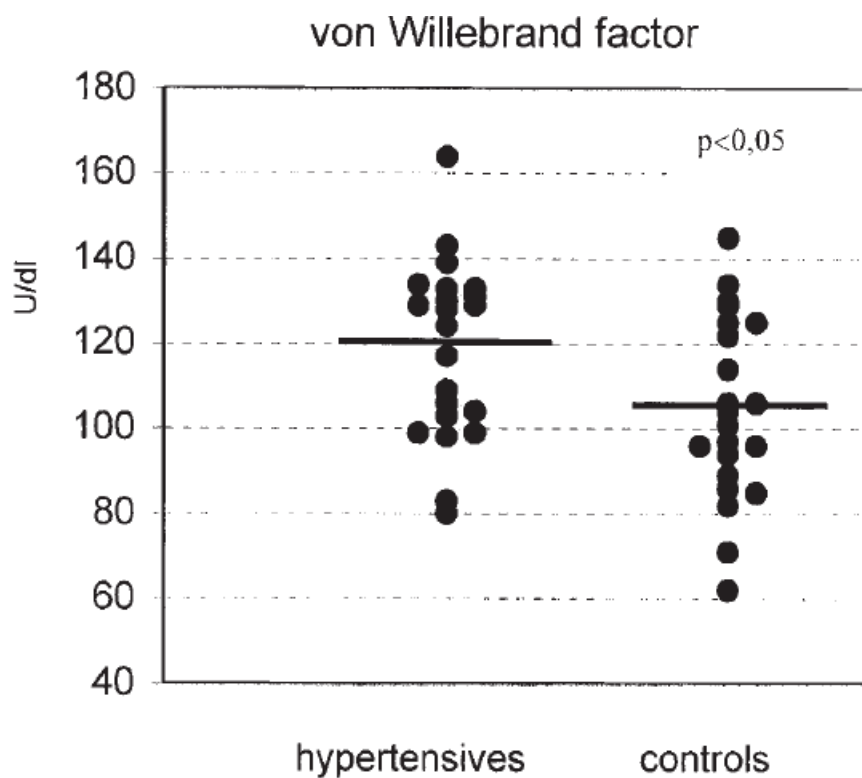
	Kontroly (NT) (n=22)	Hypertonici (EH) (n=22)	<i>p</i>
věk	46 ± 7	50 ± 10	=0.15
TK syst (mm Hg)	128 ± 10	143 ± 18	<0.001
TK diast (mm Hg)	83 ± 8	94 ± 8	<0.001
BMI (kg/m ²)	25.8 ± 2.6	27.4 ± 3.4	=0.12
Celkový cholesterol (mmol/l)	5.51 ± 0.92	5.39 ± 0.91	=0.12
Glukóza (mmol/l)	5.46 ± 0.46	5.39 ± 0.91	=0.69
Triglyceridy (mmol/l)	1.40 ± 0.82	1.64 ± 0.69	=0.33

Tabulka 1. Srovnání základních charakteristik pacientů s nekomplikovanou esenciální hypertenzí (EH) ve srovnání se zdravými kontrolami (NT). Hodnoty pro $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

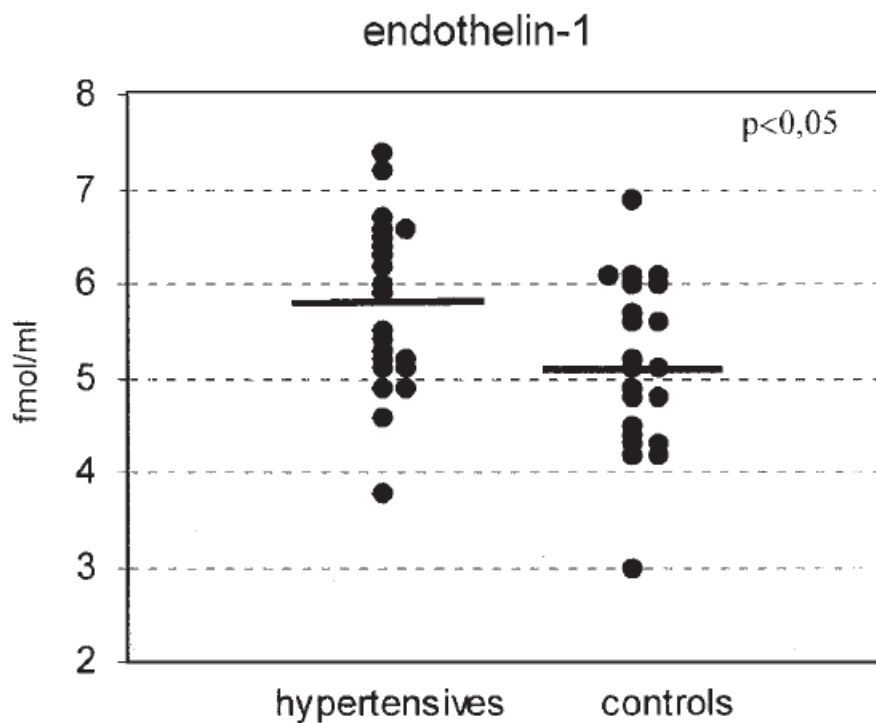
Ve skupině hypertoniků jsme zjistili signifikantně vyšší hodnoty ICAM-1, von Willebrandova faktoru a endothelinu-1 ve srovnání s normotenzními kontrolami.



Graf 1. Distribuce hodnot ICAM-1 (intercelulární adhesivní molekula 1) mezi hypertoniky a normotenzními kontrolami.



Graf 2. Distribuce hodnot vWf (von Willebrandova faktoru) mezi hypertoniky a normotenzními kontrolami.



Graf 3. Distribuce hodnot endotelinu mezi hypertoniky a normotenzními kontrolami.

		kontroly <i>n</i> =22	hypertronici <i>n</i> =22	hypertronici po th ACE/I <i>n</i> =22
vWf	(U/dl)	105 ± 21.7	119 ± 20.8 <i>P1</i> = 0.02	116 ± 16.6 <i>P2</i> = 0.24
sICAM-1	(ng/mL)	208 ± 28.7	238 ± 49.7 <i>P1</i> < 0.05	227 ± 44.1 <i>P2</i> = 0.11
sE-selectin	(ng/mL)	31.9 ± 11.3	34.9 ± 14.6 <i>P1</i> < 0.05	32.0 ± 13.1 <i>P2</i> = 0.44
sP-selectin	(ng/mL)	132 ± 34.6	136 ± 42.1 <i>P1</i> = 0.75	134 ± 38.8 <i>P2</i> = 0.71
Endotelin-1	(fmol/ml)	5.14 ± 0.90	5.76 ± 0.90 <i>P1</i> < 0.05	5.28 ± 0.94 <i>P2</i> < 0.01
Fibrinogen	(g/L)	2.67 ± 0.57	2.83 ± 0.45 <i>P1</i> = 0.33	2.76 ± 0.41 <i>P2</i> = 0.48
tPA	(ng/ml)	3.96 ± 1.28	4.21 ± 1.30 <i>P1</i> = 0.53	3.98 ± 1.53 <i>P2</i> = 0.42
PAI	(ng/ml)	68.7 (40.5, 99.5)	72.3 (62.4, 106) <i>P1</i> = 0.14	85.2 (61.2, 105) <i>P2</i> = 0.80

Tabulka 2. shrnuje a srovnává výsledky hypertoniků za bazálního stavu a po léčbě inhibitorem ACE se zdravými kontrolami.

Tříměsíční léčba inhibitorem ACE quinaprilem vedla k signifikantnímu snížení hladin endotelinu-1 (5.76 vs 5.28 fmol/ml $p < 0,01$).

Hladiny ICAM-1 vykazaly po léčbě pouze statisticky nevýznamný trend k poklesu.

Hladiny E-selectinu, P selektinu, vWf a hemokoagulačních parametrů (fibrinogenu, tPA a PAI-1) nebyly léčbou quinaprilem statisticky významně ovlivněny¹⁵⁷.

Výsledky včetně tabulek jsou též uvedeny v originálním článku *Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors* **příloha 4.**

DISKUSE

Studie s cytoadhesivními molekulami u hypertoniků byly doposud prováděny většinou na souborech pacientů, kteří měli manifestní aterosklerotické postižení nebo jiné závažné metabolické změny. Náš soubor byl homogenní a umožnil studovat „čistě hypertenzi“ navozené změny endotelu bez dalších matoucích faktorů. Skupina zdravých dobrovolníků, kteří měli odpovídající věk, antropometrické i základní biochemické parametry může poukázat na rozdíl funkce endotelu u zdravých jedinců a jinak zdravých pacientů pouze s vyšším krevním tlakem – tedy v počátečním stadiu onemocnění.

Prokázali jsme, že pacienti s mírnou nekomplikovanou arteriální hypertenzí bez jakýchkoli orgánových změn nebo manifestní aterosklerózy již mají elevované hladiny ICAM-1 a von Willebrandova faktoru. Aktivovaný systém renin angiotensin aldosteron může způsobovat endoteliální dysfunkci. Pastore a kolegové prokázali zvýšení exprese ICAM-1 po intravenosní infusi angiotensinu II ¹⁵⁸. Byla také prokázána stimulace produkce endothelinu 1 a PAI1 angiotensinem II in vivo ¹⁵⁹.

Nález vyšších hladin vWf u pacientů s mírnou a nekomplikovanou hypertenzí byl neočekávaný. Doposud byly vyšší hladiny vWf spojovány se stavy pokročilé aterosklerózy ¹⁶⁰, na naší populaci u pacientů s esenciální hypertenzí popsali zvýšené hladiny vWf oproti zdravým kontrolám také Petrák a kolegové ¹⁶¹.

Na rozdíl od jiných autorů jsme nepozorovali zvýšené hladiny E selektinu ¹⁶². Většina předchozích studií s cytoadhesivními molekulami a arteriální hypertenzí byla prováděna na pacientech s kumulací rizikových faktorů aterosklerózy, jako jsou např. kouření, hyperlipidemie, porušená glukozová tolerance. Fakt, že v našem souboru byli pouze nemocní s hypertenzí bez dalších rizikových faktorů, by se mohl podílet na profilu laboratorních nálezů.

Nalezli jsme významně zvýšené hladiny endotelinu-1 u skupiny hypertoniků. Endotelin je významným vasokonstriktorem a mitogenním faktorem, který se může podílet na zvýšené periferní cévní rezistenci a endoteliální dysfunkci u pacientů s hypertenzí. Tříměsíční léčba inhibitory ACE vedla ke statisticky významnému poklesu a normalizaci hladin endotelinu-1. Snížení hladin endotelinu považujeme za jeden ze zásadních prospěšných efektů léčby inhibitory ACE.

Hladiny cytoadhesivních molekul E-selectinu a P-selectinu a vWf sice po léčbě quinaprilem lehce klesly, ale pokles nedosáhl statistické významnosti. Příčinou může být relativně malý soubor pacientů $n=22$ nebo relativně nižší dávky inhibitoru ACE nebo relativně krátká perioda jejich podávání. Existuje evidence, že efekt léčby inhibitorem ACE na hladiny cytoadhesivních molekul přímo koreluje s dávkou inhibitoru ACE ¹⁶³. Navíc většina velkých klinických studií, které prokázaly benefit léčby inhibitory ACE používala obvykle dávky, které byly téměř dvojnásobné oproti běžně podávaným v klinické praxi ⁹³.

Blokádou systému RAAS dochází ke snižování angiotensinem II navozené exprese ET-1. Navíc inhibicí aktivity ACE – je snižováno odbourávání bradykininu, který má na endotel příznivé vasodilatační a antitrombotické účinky. Blokádou ACE také dochází ke snížení produkce aldosteronu, protože hlavním stimulem jeho tvorby v nadledvině i v cévní stěně je působení angiotensinu II na AT₁ receptor. V současné době, kdy je přehodnocována role angiotensinu II a aldosteronu, by bylo zajímavé na větším souboru randomizovat tyto pacienty na 3 větve léčby ACE-I, inhibitor MR receptoru např. eplerenon a ARB- blokátor AT₁ receptoru pro angiotensin II, což by mohlo spolu se znalostí hladin cirkulujícího angiotensinu II přinést zajímavé nálezy stran vlivu jednotlivých skupin v kaskádě RAAS na finální expresi cytoadhesivních molekul, endothelinu a dalších markerů endoteliální dysfunkce jako to bylo například provedeno na příkladu diabetické nefropatie s překvapivými výsledky ⁴².

Systém renin – angiotensin - aldosteron ovlivňuje časně endoteliální molekulární změny u pacientů s mírnou hypertenzí, u kterých ještě nedošlo k rozvoji orgánových komplikací. Léčba arteriální hypertenze inhibitory ACE pomáhá normalizovat poškozenou funkci endotelu u nekomplikované esenciální arteriální hypertenze ještě před rozvojem orgánových změn.

ZÁVĚR

V naší studii jsme prokázali u pacientů s nekomplikovanou arteriální hypertenzí bez klinických známek aterosklerózy zvýšené hladiny cirkulujících markerů endoteliální dysfunkce v plasmě oproti zdravým kontrolám. Dále jsme prokázali významný pokles hladin vasokonstriktoru endotelinu-1 po 3 měsících léčby inhibitory ACE u pacientů s nekomplikovanou arteriální hypertenzí.

Domníváme se, že zásah do systému renin angiotensin aldosteron je klíčový již na začátku léčby esenciální hypertenze v období subklinických orgánových změn.

Systém renin – angiotensin - aldosteron funguje jako jeden z hlavních regulačních systémů řídících krevní tlak a intravaskulární objem. Studium genetických predispozicí i časných změn na úrovni molekul ve stěně cévní v počátečních stádiích hypertenze může pomoci zkvalitnit a zacílit léčbu hypertenze a včas zabránit orgánovým komplikacím.

SEZNAM ZKRATEK

ACE – angiotensin konvertující enzym

ACTH – kortikotropin

ANOVA – analysis of variance – analýza rozptylu

ANP - atriální natriuretický peptid

Akt – protein kináza B (PKB)

ARB – blokátor receptoru pro angiotensin

ASE – americká společnost pro echokardiografii

AT₁R – receptor pro angiotensin II typu 1

Ang I – angiotensin I

Ang II – angiotensin II

BNP – brain natriuretic peptide

BSA – tělesný povrch (body surface area)

CNS – centrální nervový systém

CT – computerová tomografie

CYP11B1 – 11beta hydroxyláza

CYP11B2 – aldosteron syntáza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EF – ejekční frakce levé komory srdeční

EDHF – endothelium derived hyperpolarizing factor

EDRF – endothelium derived relaxing factor = oxid dusnatý NO

ELISA – enzyme linked immuno assay

ENaC – epiteliální sodíkový kanál

ERK – extracelulárním signálem regulovaná kináza

ET-1 – endotelin- 1

ET_A receptor – receptor typu A pro endotelin

GSK3β - Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP- guanosin trifosfátu

HaeIII – restriční endonukleáza izolovaná z bakterie *Haemophilus aegyptius*

IVS – interventrikulární septum

ICAM – intercelular adhesion molecule

LFA -lymphocyte fuction associated antigen, cytoadhesivní molekula z třídy integrinů

LK – levá komora srdeční

LVMI – index hmotnosti levé komory left ventricular mass index
MR – mineralokortikoidní receptor
MIBG - Metaiodbenzylguanidin
MCP-1 – monocyte chemotactic protein
NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
NFAT – rodina transkripčních faktorů podle Nuclear factor of activated T-cells
NFκB – nuclear factor kappa B
NMR – nukleární magnetická rezonance
NOS – nitric oxide synthase
NYHA – New York Heart Association – klasifikace stupně srdečního selhání
PAI-1 - inhibitor aktivátoru plasminogenu
PECAM-1 platelet endothelial cell adhesion molecule = CD 31
PI3K- fosfoinositol 3 kináza
PK – pravá komora
PKA – protein kináza A
PKB – protein kináza B
RAAS – systém renin angiotensin aldosteron
RFLP – metoda polymorfismu restrikčních fragmentů
RIA – radio immuno assay
RWT - relative wall thicknes relativní tloušťka stěny
SF-1 - steroidogenní faktor 1
SHR – spontánně hypertenzní krysa
Src - nереceptorická tyrosin kináza
StaR – steroidogenic acute regulatory protein
Taq – termostabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*
TGF – β transformující růstový faktor beta
tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu
VCAM – vascular cell adhesion molecule
VLA - very late antigen – třída cytoadhesivních molekul ze skupiny integrinů
vWf- von Willebrandův faktor
zsLK – zadní stěna levé komory

LITERATURA

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. Apr 29 1993;362(6423):801-809.
2. Manyari DE. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. Dec 13 1990;323(24):1706-1707.
3. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*. Mar 1 1991;114(5):345-352.
4. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. Nov 1993;171(3):223-229.
5. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet*. Sep 1992;2(1):66-74.
6. Botero-Velez M, Curtis JJ, Warnock DG. Brief report: Liddle's syndrome revisited--a disorder of sodium reabsorption in the distal tubule. *N Engl J Med*. Jan 20 1994;330(3):178-181.
7. Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP. [Genetics and arterial hypertension: 3 approaches to decode a complex disease]. *Bull Acad Natl Med*. 2002;186(9):1595-1606; discussion 1606-1599.
8. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*. May 2012;33(9):1058-1066.
9. Esler M, Jennings G, Korner P, Blombery P, Sacharias N, Leonard P. Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. *Am J Physiol*. Jul 1984;247(1 Pt 1):E21-28.
10. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. Sep 27 1984;311(13):819-823.
11. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. May 23 1996;334(21):1349-1355.
12. Esler M, Jennings G, Korner P, et al. Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension*. Jan 1988;11(1):3-20.
13. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone in the brain. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2009;297(3):F559-576.
14. Esler MD, Krum H, Schlaich M, Schmieder RE, Bohm M, Sobotka PA. Renal sympathetic denervation for treatment of drug-resistant hypertension: one-year results from the Symplicity HTN-2 randomized, controlled trial. *Circulation*. Dec 18 2012;126(25):2976-2982.
15. Holmer SR, Hengstenberg C, Mayer B, et al. Marked suppression of renin levels by beta-receptor blocker in patients treated with standard heart failure therapy: a potential mechanism of benefit from beta-blockade. *J Intern Med*. Feb 2001;249(2):167-172.
16. Funder JW. Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology*. Dec 2006;147(12):5564-5567.
17. Fuller PJ, Yao Y, Yang J, Young MJ. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol*. Apr 2012;213(1):15-24.
18. Salyer SA, Parks J, Barati MT, et al. Aldosterone regulates Na, K ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*. May 15 2013.

19. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. Jun 1991;83(6):1849-1865.
20. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. Jul 2005;186(1):1-20.
21. White PC. Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun 2003;88(6):2376-2383.
22. Stockand JD. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 2002;282(4):F559-576.
23. Wulff P, Vallon V, Huang DY, et al. Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest*. Nov 2002;110(9):1263-1268.
24. Mastroberardino L, Spindler B, Forster I, et al. Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*. Dec 1998;9(12):3417-3427.
25. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2003;284(1):H176-184.
26. Blazer-Yost BL, Liu X, Helman SI. Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. *Am J Physiol*. May 1998;274(5 Pt 1):C1373-1379.
27. Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A. Aldosterone induces elastin production in cardiac fibroblasts through activation of insulin-like growth factor-I receptors in a mineralocorticoid receptor-independent manner. *Am J Pathol*. Sep 2007;171(3):809-819.
28. Brem AS. Targeting activated mineralocorticoid receptor: Occam's razor revisited. *Kidney Int*. Sep 2012;82(6):619-620.
29. Evans RM, Arriza JL. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron*. Feb 1989;2(2):1105-1112.
30. Wendler A, Albrecht C, Wehling M. Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited. *Steroids*. Aug 2012;77(10):1002-1006.
31. Gros R, Ding Q, Sklar LA, et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*. Mar 2011;57(3):442-451.
32. Funder JW. GPR30, mineralocorticoid receptors, and the rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*. Vol 57. United States; 2011:370-372.
33. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. Apr 19 2005;45(8):1243-1248.
34. Tanabe A, Naruse M, Naruse K, et al. Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res*. Jun 1997;20(2):85-90.
35. Indra T, Holaj R, Zelinka T, et al. Left ventricle remodeling in men with moderate to severe volume-dependent hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Dec 2012;13(4):426-434.
36. Widimský J, Jr., Štrauch B, Petrák O, et al. Vascular disturbances in primary aldosteronism: clinical evidence. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(6):529-533.
37. Holaj R, Zelinka T, Wichterle D, Petrák O, Štrauch B, Widimsky J, Jr. Increased intima-media thickness of the common carotid artery in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *J Hypertens*. Jul 2007;25(7):1451-1457.
38. Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, et al. Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol*. Jan 21 1993;71(3):17a-20a.
39. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension*. Apr 2005;45(4):710-716.
40. Bomback AS, Klemmer PJ. Mineralocorticoid receptor blockade in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2012;33(1-3):119-124.

41. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension*. Jan 2003;41(1):64-68.
42. Mehdi UF, Adams-Huet B, Raskin P, Vega GL, Toto RD. Addition of angiotensin receptor blockade or mineralocorticoid antagonism to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. Dec 2009;20(12):2641-2650.
43. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, et al. Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. Sep 2006;1(5):940-951.
44. Luther JM, Luo P, Wang Z, et al. Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury. *Kidney Int*. Sep 2012;82(6):643-651.
45. Widimský J, Jr., Šindelka G, Haas T, Prázný M, Hilgertová J, Škrha J. Impaired insulin action in primary hyperaldosteronism. *Physiol Res*. 2000;49(2):241-244.
46. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 25 2003;100(24):14211-14216.
47. Ehrhart-Bornstein M, Arakelyan K, Krug AW, Scherbaum WA, Bornstein SR. Fat cells may be the obesity-hypertension link: human adipogenic factors stimulate aldosterone secretion from adrenocortical cells. *Endocr Res*. Nov 2004;30(4):865-870.
48. Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A, et al. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. Oct 2007;50(4):750-755.
49. Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. Mar-Apr 2010;52(5):401-409.
50. Štrauch B, Zelinka T, Hampf M, Bernhardt R, Widimský J, Jr. Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J Hum Hypertens*. May 2003;17(5):349-352.
51. Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. Jun 24 2008;117(25):e510-526.
52. Gaddam Kk NMKP-UMN, et al. Characterization of resistant hypertension: Association between resistant hypertension, aldosterone, and persistent intravascular volume expansion. *Archives of Internal Medicine*. 2008;168(11):1159-1164.
53. Calhoun DA. Low-dose aldosterone blockade as a new treatment paradigm for controlling resistant hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. Jan 2007;9(1 Suppl 1):19-24.
54. Pimenta E, Calhoun DA. Resistant hypertension and aldosteronism. *Curr Hypertens Rep*. Nov 2007;9(5):353-359.
55. Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E, et al. Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma. *Circulation*. Mar 18 1997;95(6):1471-1478.
56. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. Dec 1992;120(6):893-901.
57. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. Jun 1994;93(6):2578-2583.
58. Sato A, Saruta T. Aldosterone-induced organ damage: plasma aldosterone level and inappropriate salt status. *Hypertens Res*. May 2004;27(5):303-310.
59. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol*. Feb 2001;37(2):662-667.

60. Packer M. New concepts in the pathophysiology of heart failure: beneficial and deleterious interaction of endogenous haemodynamic and neurohormonal mechanisms. *J Intern Med.* Apr 1996;239(4):327-333.
61. Pitt B. "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther.* Feb 1995;9(1):145-149.
62. Horky K. [Aldosterone as an endogenous cardiovascular toxin and the options for its therapeutic management]. *Vnitr Lek.* Dec 2011;57(12):1012-1016.
63. Sato A, Suzuki Y, Saruta T. Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* Mar 1999;22(1):17-22.
64. Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation.* Oct 14 2003;108(15):1831-1838.
65. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation.* Nov 1990;82(5):1730-1736.
66. Delyani JA, Rocha R, Cook CS, et al. Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist (SARA). *Cardiovasc Drug Rev.* Fall 2001;19(3):185-200.
67. Sato A, Saruta T. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Int Med Res.* 2001 Jan-Feb 2001;29(1):13-21.
68. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* Sep 2 1999;341(10):709-717.
69. Pitt B, Williams G, Remme W, et al. The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther.* Jan 2001;15(1):79-87.
70. Zannad F, McMurray JJ, Drexler H, et al. Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Eur J Heart Fail.* Jun 2010;12(6):617-622.
71. Phelan D, Thavendiranathan P, Collier P, Marwick TH. Aldosterone antagonists improve ejection fraction and functional capacity independently of functional class: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart.* Dec 2012;98(23):1693-1700.
72. Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, Meltendorf U, Geller JC, Klein HU. Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* Oct 15 2001;88(8):906-909, a908.
73. Shroff SC, Ryu K, Martovitz NL, Hoit BD, Stambler BS. Selective aldosterone blockade suppresses atrial tachyarrhythmias in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol.* May 2006;17(5):534-541.
74. Swedberg K. Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* // 2012;59:1598-1603.
75. Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, et al. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J.* Oct 2005;26(20):2193-2199.
76. Zhao J, Li J, Li W, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol.* Apr 2010;159(8):1584-1594.
77. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* Jul 2006;86(3):747-803.

78. Schrotten NF, Gaillard CA, van Veldhuisen DJ, Szymanski MK, Hillege HL, de Boer RA. New roles for renin and prorenin in heart failure and cardiorenal crosstalk. *Heart Fail Rev*. Mar 2012;17(2):191-201.
79. Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y, et al. Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. *Hypertension*. May 2002;39(5):958-962.
80. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation*. Jan 2 2001;103(1):72-77.
81. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)*. Apr 2002;102(4):381-386.
82. Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, et al. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. *Kidney Int*. Apr 2000;57(4):1346-1351.
83. Tait SA, Tait JF, Coghlan JP. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Mol Cell Endocrinol*. Mar 31 2004;217(1-2):1-21.
84. Spyroglou A, Manolopoulou J, Wagner S, Bidlingmaier M, Reincke M, Beuschlein F. Short term regulation of aldosterone secretion after stimulation and suppression experiments in mice. *J Mol Endocrinol*. May 2009;42(5):407-413.
85. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol*. Apr 2002;28(2):125-135.
86. Rossi GP, Albertin G, Bova S, et al. Autocrine-paracrine role of endothelin-1 in the regulation of aldosterone synthase expression and intracellular Ca²⁺ in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Endocrinology*. Oct 1997;138(10):4421-4426.
87. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*. Aug 1 1999;43(2):300-307.
88. White PC. Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med*. Jul 28 1994;331(4):250-258.
89. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res*. Feb-May 1995;21(1-2):437-442.
90. Amar L, Azizi M, Menard J, Peyrard S, Watson C, Plouin PF. Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. Nov 2010;56(5):831-838.
91. Calhoun DA, White WB, Krum H, et al. Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. *Circulation*. Nov 1 2011;124(18):1945-1955.
92. Azizi M, Amar L, Menard J. Aldosterone synthase inhibition in humans. *Nephrol Dial Transplant*. Jan 2013;28(1):36-43.
93. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. Jan 20 2000;342(3):145-153.
94. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. Apr 2002;109 Suppl:S67-79.
95. Molkentin JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:391-426.
96. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79.
97. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*. Jul 1992;20(1):67-73.

98. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. Sep 30 1994;269(39):24316-24320.
99. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*. Dec 1995;26(6 Pt 1):971-978.
100. Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell*. Sep 3 1999;98(5):555-558.
101. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension*. Feb 1999;33(2):703-707.
102. Staessen JA, Wang JG, Brand E, et al. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens*. Aug 2001;19(8):1349-1358.
103. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension*. Aug 1998;32(2):198-204.
104. Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, et al. Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res*. Mar 2001;24(2):105-109.
105. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens*. May 2002;15(5):389-393.
106. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, et al. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation*. Feb 17 1998;97(6):569-575.
107. Delles C, Erdmann J, Jacobi J, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is associated with left ventricular structure in human arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. Mar 1 2001;37(3):878-884.
108. Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, et al. Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. Jan 21 2004;43(2):265-270.
109. Horký K, Jáchymová M, Jindra A, et al. Some metabolic, humoral and genetic aspects of arterial hypertension. *Pol Arch Med Wewn*. 1997;97 Spec No:23-33.
110. Allemann Y, Weidmann P. Cardiovascular, metabolic and hormonal dysregulations in normotensive offspring of essential hypertensive parents. *J Hypertens*. Feb 1995;13(2):163-173.
111. Heller S, Linhart A, Jindra A, et al. Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men. *Blood Press*. 2004;13(3):158-163.
112. Hlubocká Z, Jáchymová M, Heller S, et al. Association of the -344T/C aldosterone synthase gene variant with essential hypertension. *Physiol Res*. 2009;58(6):785-792.
113. Sookoian S, Gianotti TF, Pirola CJ. Role of the C-344T aldosterone synthase gene variant in left ventricular mass and left ventricular structure-related phenotypes. *Heart*. Jul 2008;94(7):903-910.
114. Sookoian S, Gianotti TF, Gonzalez CD, Pirola CJ. Association of the C-344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens*. Jan 2007;25(1):5-13.
115. Buss SJ, Backs J, Kreusser MM, et al. Spironolactone preserves cardiac norepinephrine reuptake in salt-sensitive Dahl rats. *Endocrinology*. May 2006;147(5):2526-2534.
116. Huang BS, White RA, Ahmad M, Jeng AY, Leenen FH. Central infusion of aldosterone synthase inhibitor prevents sympathetic hyperactivity and hypertension by central Na⁺ in Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jul 2008;295(1):R166-172.

117. Yu Y, Wei SG, Zhang ZH, Gomez-Sanchez E, Weiss RM, Felder RB. Does aldosterone upregulate the brain renin-angiotensin system in rats with heart failure? *Hypertension*. Mar 2008;51(3):727-733.
118. Linhart A, Sedláček K, Jáchymová M, et al. Lack of association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men. *Blood Press*. 2000;9(1):47-51.
119. Jáchymová M, Widimský J, Horký K. The -344T/C polymorphism of CYP11B2 gene is associated with essential hypertension and primary aldosteronism. 18th Scientific Meeting of the European Society of Hypertension/22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Berlin, Poster; 2008.
120. Lim PO, Macdonald TM, Holloway C, et al. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 2002;87(9):4398-4402.
121. Montgomery H, Clarkson P, Barnard M, et al. Angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. *Lancet*. Feb 13 1999;353(9152):541-545.
122. Johnson BD, Mather KJ, Wallace JP. Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc Med*. Oct 2011;16(5):365-377.
123. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl*. Sep 1998;67:S100-108.
124. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*. Jan 14 1988;331(6152):168-170.
125. Patrick CW, Jr., McIntire LV. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Blood Purif*. 1995;13(3-4):112-124.
126. Marečková Z, Heller S, Horký K. [Endothelial dysfunction and arterial hypertension]. *Vnitr Lek*. Apr 1999;45(4):232-237.
127. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1987;84(24):9265-9269.
128. Luscher TF. Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J*. Sep 1992;13 Suppl D:50-55.
129. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827-872.
130. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med*. Jun 6 1996;334(23):1526-1529.
131. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med*. Jul 4 1996;335(1):43-45.
132. Born G., Colin S. *Vascular Endothelium, Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*: F.K.Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany; 1997.
133. Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. Apr 15 1992;148(8):2423-2428.
134. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med*. Jul 1999;107(1):85-97.
135. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. Feb 1993;91(2):379-387.
136. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. Oct 1993;14(10):506-512.
137. Kolb-Bachofen V, Kuhn A, Suschek CV. The role of nitric oxide. *Rheumatology (Oxford)*. Oct 2006;45 Suppl 3:iii17-19.
138. Sharma JN. Hypertension and the bradykinin system. *Curr Hypertens Rep*. Jun 2009;11(3):178-181.

139. Wheeler-Jones CP. Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by protease-activated receptors: mechanisms and significance. *Pharmacol Rep.* Jan-Feb 2008;60(1):109-118.
140. Ohkita M, Tawa M, Kitada K, Matsumura Y. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci.* 2012;119(4):302-313.
141. Widimský J, Jr., Horký K. [Endothelin--a vasoactive peptide of endothelial cells]. *Cas Lek Cesk.* Apr 5 1993;132(7):215-218.
142. Horký K, Němeček K, Widimský J, Jr., et al. [Endothelin plasma levels in various stages and types of arterial hypertension]. *Cas Lek Cesk.* Jun 27 1994;133(13):407-410.
143. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* Mar 15 1991;114(6):464-469.
144. Hazan-Halevy I, Levy T, Wolak T, Lubarsky I, Levy R, Paran E. Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. *J Hypertens.* Jun 2005;23(6):1183-1190.
145. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, et al. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens.* Apr 1999;17(4):537-545.
146. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* Oct 1 2007;204(10):2449-2460.
147. Nagata D, Takahashi M, Sawai K, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension.* Jul 2006;48(1):165-171.
148. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* Sep 2 2005;97(5):434-442.
149. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension.* Feb 2008;51(2):161-167.
150. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* Feb 15 1996;93(4):672-682.
151. Fasching P, Waldhausl W, Wagner OF. Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM--potential mediators in diabetic macroangiopathy. *Diabetologia.* Oct 1996;39(10):1242-1244.
152. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation.* Jan 30 2001;103(4):491-495.
153. Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA, Koomans HA, Fijnheer R, Rabelink TJ. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating P-selectin. *J Hypertens.* Jan 1998;16(1):45-50.
154. Krejcy K, Eichler HG, Jilma B, et al. Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can J Physiol Pharmacol.* Jan 1996;74(1):9-14.
155. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* Jul 2008;29(7):367-374.
156. Gasic S, Wagner OF, Fasching P, et al. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. *Am J Hypertens.* Feb 1999;12(2 Pt 1):217-222.
157. Hlubocká Z, Umnerová V, Heller S, et al. Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors. *J Hum Hypertens.* Aug 2002;16(8):557-562.

- 158.** Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. Oct 12 1999;100(15):1646-1652.
- 159.** Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation*. Jun 1993;87(6):1969-1973.
- 160.** Blann AD, Waite MA. von Willebrand factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in predicting the progression of atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. Feb 1996;7(2):143-147.
- 161.** Petrak O, Widimsky J, Jr., Zelinka T, et al. Biochemical markers of endothelial dysfunction in patients with endocrine and essential hypertension. *Physiol Res*. 2006;55(6):597-602.
- 162.** Blann AD, Tse W, Maxwell SJ, Waite MA. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens*. Aug 1994;12(8):925-928.
- 163.** Ferri C, Desideri G, Valenti M, et al. Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*. Oct 1999;34(4 Pt 1):568-573.

PŘÍLOHY

1. **Heller S**, Linhart A, Jindra A, Jáchymová M, Horký K, Peleška J, Hlubocká Z, Umnerová V, Aschermann M. Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men. *Blood Press* 2004;**13**(3):158-63
2. Hlubocká Z, Jáchymová M, **Heller S**, Umnerová V, Danzig V, Lánská V, Horký K, Linhart A. Association of the -344T/C aldosterone synthase gene variant with essential hypertension. *Physiol Res* 2009;**58**(6):785-92
3. Linhart A, Sedláček K, Jáchymová M, Jindra A, Beran S, Vondráček V, **Heller S**, Horký K., et al. Lack of association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men. *Blood Press* 2000;**9**(1):47-51
4. Hlubocká Z, Umnerová V, **Heller S**, Peleška J, Jindra A, Jáchymová M, Kvasnička J, Horký K, Aschermann M. Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors. *J Hum Hypertens* 2002;**16**(8):557-62

Heller S, Linhart A, Jindra A, Jáchymová M, Horký K, Peleška J,
Hlubocká Z, Umnerová V, Aschermann M.

**Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism
(CYP11B2) with left ventricular structure and humoral
parameters in young normotensive men.**

Blood Press 2004;13(3):158-63

Association of –344/T/C Aldosterone Synthase Polymorphism (CYP11B2) with Left Ventricular Structure and Humoral Parameters in Young Normotensive Men

SAMUEL HELLER, ALEŠ LINHART, ANTONÍN JINDRA, MARIE JÁCHYMOVÁ, KAREL HORKÝ, JAN PELEŠKA, ZUZANA HLUBOCKÁ, VĚRA UMNEROVÁ AND MICHAEL ASCHERMANN

From the 2nd Department of Internal Medicine, 1st School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Heller S, Linhart A, Jindra A, Jáchymová M, Horký K, Peleška J, Hlubocká Z, Umnerová V, Aschermann M. Association of –344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men. *Blood Pressure* 2004; 13: 158–163.

Background: Aldosterone plays an important role in development of left ventricular (LV) hypertrophy and myocardial fibrosis. We assessed the influence of the T-344C polymorphism of aldosterone synthase – the rate-limiting enzyme in aldosterone biosynthesis – on the structure of the left ventricle in young normotensive men. **Design and methods:** The population included 113 normotensive mid-European Caucasian men aged 18–40 years (mean 27 ± 5 years). The genotype was assessed using polymerase chain reaction with subsequent cleavage with restriction enzyme HaeIII (restriction fragment length polymorphism method) and visualization with ethidium bromide. Plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone were measured. All subjects were examined by echocardiography and LV mass was assessed by using M-mode based ASE formula. **Results:** The distribution of the genotypes was TT 23%:TC 55%:CC 22%. There were no differences in blood pressure among the groups. Men with the TT genotype had significantly higher levels of PRA (2.7 ± 1.7 vs 1.8 ± 1.0 vs 1.8 ± 1.1 ng/ml/h, $p < 0.01$) and slightly higher plasma levels of aldosterone (113 ± 64 vs 93 ± 43 vs 87 ± 39 pg/ml, $p = 0.12$). In the whole population, LV mass index (LVMI) did not differ significantly among the genotypes (92 ± 16 vs 86 ± 18 vs 84 ± 16 g/m², $p = 0.20$). In the population divided according to PRA, subjects with high renin had significantly higher LVMI in presence of the TT genotype (95 ± 17 vs 84 ± 16 vs 81 ± 15 g/m², $p < 0.05$). **Conclusions:** In agreement with previous studies, we found that the TT genotype of T-344C polymorphism of aldosterone synthase gene was associated with significantly higher levels of PRA in normotensive men. In subjects with high PRA, the TT genotype was associated with higher values of the LVMI. **Key words:** aldosterone synthase (CYP11B2), arterial hypertension, genetic polymorphism, left ventricular hypertrophy, left ventricular mass, renin–angiotensin–aldosterone system.

INTRODUCTION

Left ventricular (LV) hypertrophy is an independent risk factor of cardiovascular morbidity and mortality [1, 2]. Among others, the system renin–angiotensin–aldosterone plays an important role in development of LV hypertrophy. One of its effectors – aldosterone – is a hormone that influences cardiovascular system by regulating volume and sodium homeostasis. Furthermore, aldosterone is one of the strongest humoral growth factors inducing cardiomyocyte hypertrophy [3–7] and interstitial fibrosis [8]. Moreover, aldosterone increases arterial stiffness [9], which in turn potentially influences the heart by an increase in afterload. Aldosterone inhibition by antagonist spironolactone and eplerenone is capable of inducing a significant regression of LV hypertrophy in animal models and humans, in particular in patients with

essential hypertension and congestive heart failure [10–13]. In addition, in patients with severe heart failure, aldosterone inhibition significantly reduces morbidity and mortality [14].

The key enzyme of aldosterone biosynthesis is aldosterone synthase. The enzyme is a P450 mitochondrial oxidase located mainly within the zona glomerulosa of the adrenal cortex [15]. T-344C polymorphism in distal promoter of aldosterone synthase gene [16] is located in the site of binding of SF-1, a positive regulator of steroid hydroxylases and a key factor of steroidogenic cell development [17, 18]. The polymorphism has been subject of several studies, some of which brought up controversial results probably due to too many factors influencing the genotype–phenotype relationship. In our previous study, we evaluated a particularly homogenous population of young healthy normotensive men. In these

subjects, we have not found any significant influence of other polymorphisms of renin-angiotensin system, including I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and the M235T polymorphism of the angiotensinogen on LV structure and function [19]. The aim of the present study was to analyze potential associations of T-344C polymorphism in aldosterone synthase promoter and plasma aldosterone and renin levels, LV morphology and blood pressure in a homogenous population of young men.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Two hundred and nine normotensive men (blood pressure <140/<90 mmHg) were recruited from a large cross-sectional study conducted in our department. We did not include subjects taking blood pressure lowering drugs and subjects with arterial hypertension because of possible confounding findings in intermediate phenotype and influences on LVH. All subjects were without clinically apparent metabolic and cardiovascular disease. Competition and high-level athletes were excluded. From this population, 145 men underwent a complete echocardiographic study. From them we included men aged 18–40 years ($n = 138$). We excluded subjects >40 years because of prevalence of coronary artery disease and possible other accompanying disease. From them only $n = 118$ gave their consent for DNA analysis. In addition, five subjects were excluded for obesity (body mass index, BMI, >30 kg/m²) and/or a presence of asymmetric septal hypertrophy. Therefore, the final analyzed population included 113 subjects.

Clinical assessment

All subjects were examined by a senior cardiologist to exclude a significant cardiovascular, renal and metabolic disease. All the subjects had normal levels of serum glucose, cholesterol, creatinine and liver function tests. Twelve-lead ECG was recorded and blood pressure evaluated as a mean value from three successive measurements by mercury sphygmomanometer after a 45-min rest in a sitting position always measured between 08.00 and 10.00 h.

Hormonal measurements

Plasma aldosterone was determined by using radio-immunological competition assay (Immunotech, Coulter Company, Prague, Czech Republic) and expressed in picograms per milliliter (pg/ml). Plasma renin activity (PRA) was also determined by radioimmunological competition assay (Immunotech) in nanograms per milliliter per hour (ng/ml/h). Patients were left in a sitting position for 45 min before samples were drawn, in a recumbent

position in fasting state and always between 08.00 and 10.00 h.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and genotyping of CYP11B2 fragments

DNA was extracted from peripheral leucocytes. The PCR was performed using Taq polymerase Boehringer Ingelheim and oligonucleotide primers CTCACCCAGGAA-CCTGCTCTGGAAACATA and CAGGAGGGATGAGCAGGCAGAGCACAG using hot start and touchdown PCR to increase specificity of the reaction. PCR was subjected to 94°C for 30 s and from 62° to 58°, two cycles 1°C lower temperature annealing, 72° for 30 s for amplification to the total amount of 35 cycles followed by final extension for 5 min, producing a fragment of 636 bp. This fragment was subsequently cleaved by HaeIII, creating fragments for allele T 402, 138, 51 and 48 bp, and for allele C 334, 138, 69, 51 and 48 bp, which were subjected to electrophoresis on a metaphoragarose gel and visualized with ethidium bromide.

Echocardiography

Echocardiographic evaluation was performed by two skilled operators blinded to the DNA analysis result. In all subjects, thickness and diameters were measured according to the recommendations of American Society of Echocardiography [20, 21] on the M-mode as follows: interventricular septum (IVSd), posterior wall (PWd) and internal diameter (LVd). Left atrial diameter was measured at the moment of aortic valve closure. All measurements were performed online at least three times and averaged. LV mass was calculated according to the Devereux modified ASE cube formula [22] and indexed for body surface area (BSA) [23] Ejection fraction (EF) was calculated using the single-plane area-length method.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using JMP 3.2 statistical software (SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). Group data are expressed as means \pm SD. Differences between multiple groups were tested using analysis of variance (ANOVA) and differences between two groups by the unpaired Student's *t*-test using Bonferroni correction. A statistically significant result was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

Population characteristics

The population included 113 men. The mean age was 26.6 ± 5.4 years. Distribution of the genotypes was TT 23%, TC 55% and CC 22%. The allele frequency was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. Main

Table I. General characteristics of the study population according to aldosterone synthase polymorphism

	Aldosterone-synthase polymorphism			p, ANOVA
	CC, n = 25	TC, n = 62	TT, n = 26	
Age (years)	25 ± 5	27 ± 5	28 ± 6	ns
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	117 ± 11	119 ± 10	119 ± 10	ns
Diastolic	79 ± 7	79 ± 8	82 ± 8	ns
Height (m)	181 ± 7	181 ± 6	181 ± 5	ns
Weight (kg)	78 ± 11	78 ± 11	79 ± 14	ns
Body surface area (m ²)	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	ns
Body mass index (kg/m ²)	24 ± 3	24 ± 3	24 ± 4	ns

ANOVA, analysis of variance; ns, not significant.

Table II. Humoral characteristics according to aldosterone synthase polymorphism

	Aldosterone-synthase polymorphism			p, ANOVA
	CC, n = 25	TC, n = 62	TT, n = 26	
PRA (ng/ml/h)	1.8 ± 1.1	1.8 ± 1.0	2.7 ± 1.7*	p < 0.01*
Aldosterone (pg/ml)	87 ± 39.0	93.2 ± 42.7	113 ± 64.0	p = 0.12
Aldosterone/PRA ratio	76 ± 73	65 ± 36	52 ± 35	ns

ANOVA, analysis of variance; PRA, plasma renin activity; ns, not significant. *Statistically significant for p < 0.05.

characteristics of the subgroups according to the genotypes are listed in Table I. There were no significant differences with respect to age, body build and blood pressure between the genotype subgroups.

PRA and aldosterone levels

Men with the TT genotype had significantly higher levels of PRA (2.7 ± 1.7 vs 1.8 ± 1.0 vs 1.8 ± 1.1 ng/ml/h, in TT, TC and CC, respectively, $p < 0.01$). In this genotype, we also observed a non-significant tendency towards higher plasma levels of aldosterone (113 ± 64 vs 93 ± 43 vs 87 ± 39 pg/ml, $p = 0.12$) (Table II).

LV structure and function

In the whole population, LV structural parameters,

including parietal thickness, LV internal cavity diameter, and total and indexed LV mass, did not differ significantly between the subgroups according to the aldosterone synthase genotypes (Table III). Similarly, LV function as assessed by ejection fraction and transmitral filling characteristics appeared to be similar in the genotype subgroups. In the population divided by the PRA median, persons with high renin had significantly higher LV mass index (LVMI) in the presence of TT genotype (95 ± 17 vs 84 ± 16 vs 81 ± 15 g/m², $p < 0.05$). In contrast, low renin subgroups did not differ in LV mass and other echocardiographic variables (Table IV).

DISCUSSION

In our study, we evaluated T-344C polymorphism of

Table III. Echocardiographic parameters of studied population

	Aldosterone synthase polymorphism			p, ANOVA
	CC, n = 25	TC, n = 62	TT, n = 26	
Ventricular septal wall thickness (mm)	8.9 ± 1.7	9.2 ± 1.7	9.7 ± 1.6	ns
LV end diastolic diameter (mm)	53.6 ± 3.5	53.8 ± 4.5	54.3 ± 3.9	ns
LV end systolic diameter (mm)	8.1 ± 1.2	8.0 ± 1.2	8.3 ± 1.2	ns
LV mass (g)	167 ± 36	170 ± 41	184 ± 40	ns
LVMI (g/m ²)	84 ± 16	86 ± 18	92 ± 15	ns
E/A peak velocity ratio	2.0 ± 0.6	1.9 ± 0.6	1.7 ± 0.6	ns
LV ejection fraction	61 ± 6%	61 ± 9%	64 ± 6%	ns

ANOVA, analysis of variance; ns, not significant; LV, left ventricular; LVMI, LV mass index.

Table IV. Blood pressure and echocardiographic parameters of studied population divided due to PRA median

	Aldosterone synthase polymorphism: low renin			
	CC, n = 14	TC, n = 32	TT, n = 9	p, ANOVA
Casual systolic blood pressure (mmHg)	118 ± 12	119 ± 10	123 ± 11	ns
Casual diastolic blood pressure (mmHg)	77 ± 7	80 ± 8	86 ± 7	p < 0.05*
Ventricular septal wall thickness (mm)	8.8 ± 1.7	9.2 ± 1.9	9.3 ± 1.5	ns
LV end systolic diameter (mm)	54.2 ± 3.5	53.9 ± 4.5	54.4 ± 3.3	ns
Ventricular posterior wall thickness (mm)	8.3 ± 1.2	7.9 ± 1.2	7.6 ± 0.8	ns
LV mass (g)	172 ± 36	172 ± 46	169 ± 27	ns
LVMI (g/m ²)	86 ± 16	86 ± 20	85 ± 12	ns
	Aldosterone synthase polymorphism: high renin			
	CC, n = 11	TC, n = 30	TT, n = 17	p, ANOVA
Casual systolic blood pressure (mmHg)	116 ± 9	119 ± 11	117 ± 10	ns
Casual diastolic blood pressure (mmHg)	81 ± 6	78 ± 8	80 ± 8	ns
Ventricular septal wall thickness (mm)	9.0 ± 1.8	9.1 ± 1.6	9.9 ± 1.7	ns
LV end systolic diameter (mm)	52.9 ± 3.7	53.6 ± 4.6	54.3 ± 4.3	ns
Ventricular posterior wall thickness (mm)	7.7 ± 1.0	8.0 ± 1.2	8.7 ± 1.2	ns
LV mass (g)	160 ± 37	168 ± 36	191 ± 45	p = 0.07
LVMI (g/m ²)	81 ± 15	85 ± 16	95 ± 17	p < 0.05*

ANOVA, analysis of variance; ns, not significant; LV, left ventricular; LVMI, LV mass index. *Statistically significant for p < 0.05.

aldosterone synthase gene in a particularly homogenous population of young normotensive men with special regard to intermediate phenotype. We excluded women from our study because of possible confusing results due to hormonal changes during the cycle.

In association studies addressing polymorphisms, a large quantity of comorbidities and even concomitant therapy – especially blood pressure lowering – may influence the final observation of blood pressure, hormonal and cardiac structural changes. Therefore, it appears to be of particular interest to exclude subjects with potentially confounding factors from these analyses.

In our study, we did not confirm any significant association of the T-344C polymorphism of aldosterone synthase gene with blood pressure levels in young normotensive men. Nevertheless, aldosterone plays an important role in water–sodium homeostasis and in intravascular volume regulation. A mutation in the gene coding for aldosterone synthase and its inappropriate regulation can lead to severe inherited hypertension as seen in example of glucocorticoide-remediable hyperaldosteronism [24]. However, studies investigating the role of aldosterone synthase polymorphisms on blood pressure gave controversial results. One of the reasons could be that in different population different genes are predominantly responsible for changes in blood pressures, e.g. a different gene influencing the genotype in the Japanese population and from that in the European population.

For example, Davies and coworkers found allele T to

be more frequent in the group of 138 hypertensive patients when compared to distribution of alleles in normotensive controls [25]. Also Brand and coworkers in their study described an association of blood pressure level with –344 T allele. However, the relationship was significant only in the subgroup of severely hypertensive patients with hypertension onset before age of 60 years with BMI >27 kg/m² [26]. In contrast, another study by Tsujita and coworkers did not confirm any role of aldosterone synthase polymorphism in determining blood pressure in a large cross-sectional “Suita study” including 4000 Japanese hypertensive and normotensive controls [27]. On the other hand, the recent work in a northern European population by Kurland et al. [28, 29], studying several polymorphisms in RAAS and their relationship to response to atenolol or irbesartan therapy, showed most pronounced systolic blood pressure response in patients with the –344 T allele when treated with irbesartan and not with atenolol.

The further observation of our study was a significant increase in plasma renin levels in subjects carrying the TT genotype but no significant differences were observed with regard to plasma aldosterone levels and aldosterone to renin ratio. We found only a tendency to higher plasma aldosterone levels in subjects with the TT genotype. This does not completely correspond to results published by Staessen, where authors described higher aldosterone secretion and lower PRA in subjects with TT genotype [30]. Komyia *et al.* noted an observation similar to our study in a population of 73 hypertensive Japanese

patients, indicating a decreased frequency of the -344C allele in low-renin hypertension [31]. In addition, Tamaki and coworkers found significantly higher plasma aldosterone to renin ratio in the persons carrying the allele C than in persons with the TT genotype [32]. These data indicate a potential functional implication of the polymorphism in regulation of the aldosterone synthase function, allele C being associated with either lower renin or higher aldosterone to renin ratio or inversely allele T being associated with higher plasma renin as in our study. One of possible explanations could be stronger binding of SF-1 regulating factor to the promoter in the T-allele as described by Basset [33]. There are also linkage disequilibria of -344C/T with the intron 2 of CYP11B2 and, as already stated by Kupari & Schunkert; this polymorphism may be in linkage disequilibria with other genes located closely, especially CYP11B1, which could be responsible for the physiological consequences. Nevertheless, available results do not allow a clear explanation of the involved mechanism.

The last observation of our study was an influence of aldosterone synthase polymorphism on LV mass, which became apparent only in conjunction with higher plasma renin activity. We found a statistically significant increase in LV mass in the high-renin TT genotype subgroup. This result may be due to chance and the small number of subsets of the study, and would require confirmation by larger studies. On the other hand, the role of aldosterone in the genesis of cardiac hypertrophy appears to be well documented. The hormone may induce an LV mass increase either by increasing pressure and volume load or by direct trophic effect on cardiomyocyte and by interstitial collagen deposition [34]. In hypertensive patients, it has been demonstrated that high serum aldosterone concentrations are significantly associated with an increase in LV mass [4-7]. The effect of aldosterone on LV hypertrophy was further confirmed by experimental and clinical studies demonstrating the efficacy of aldosterone inhibition on reversal of LV hypertrophy [10, 11]. In some studies, the CC genotype was positively correlated to LV diameter [35, 36]. Our findings correspond with recently published data by Stella & Bianchi, where LV mass and thickness were positively correlated with the number of T alleles in homogenous population of non-treated middle-aged hypertensives [37].

Potential limitations of our study should be noted. We voluntarily implicated a potential selection bias by recruiting only healthy normotensive and relatively young male individuals. Therefore, the generalization of our conclusions should be avoided. Due to the transverse character of our study, we were not able to study stimulus-activating expression of the renin-angiotensin-aldosterone system. Under such stimuli as oral sodium load, physical exercise or water depletion, the

significance of such polymorphism could become more apparent [38].

In conclusion, our study, conducted in particularly homogenous population of young normotensive men, did not show a significant association of the T-344C polymorphism of the aldosterone synthase gene with resting blood pressure levels and cardiac structure and function. A significant increase of PRA was noted in TT genotype carriers. The polymorphism -344C/T could be only a marker for a genomic change that really influences the regulation of involved physiological mechanisms, PRA being an intermediate phenotype, which can be closely related to the genotype and possibly to specific anti-hypertensive therapy response. We conclude that further investigation of the DNA region would be needed to clarify the exact mechanism of its influence on regulatory mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants from The Internal Grant Agency of Ministry of Health of The Czech Republic (IGA MZ ČR) NA/7171-3 and KP 204/98/K015.

REFERENCES

1. Levy D, *et al.* Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1561-6.
2. Koren MJ, *et al.* Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991; 114: 345-52.
3. Sato A, Funder JW, Saruta T. Involvement of aldosterone in left ventricular hypertrophy of patients with end-stage renal failure treated with hemodialysis. *Am J Hypertens* 1999 Sep; 12(9 Pt 1): 867-73.
4. Tanabe A, *et al.* Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res* 1997 Jun; 20: 85-90.
5. Rossi GP, *et al.* Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma. *Circulation* 1997; 95: 1471-8.
6. Schunkert H, *et al.* Associations between circulating components of the renin-angiotensin-aldosterone system and left ventricular mass. *Heart* 1997; 77: 24-31.
7. Duprez DA, *et al.* Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol* 1993; 71: 17-20A.
8. Young M, Fullerton M, Dillez R, Funder J. Mineralocorticoids, Hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 2578-83.
9. Lacolley P, *et al.* Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 662-7.
10. Sato A, Suzuki Y, Saruta T. Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 1999; 22: 17-22.
11. Sato A, Saruta T. Aldosterone escape during angiotensin-

- converting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Int Med Res* 2001; 29: 13–21.
12. Pitt B, *et al.* Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. The 4E-Left Ventricular Hypertrophy Study. *Circulation*. 2003; 108: 1831–8.
13. Tsutamoto T, *et al.* Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1228–33.
14. Pitt B, *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 709–17.
15. White PC. Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med* 1994; 334: 250–8.
16. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 1995; 2: 437–42.
17. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of Fushi Tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1249–58.
18. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77: 481–90.
19. Linhart A, *et al.* Lack of association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men. *Blood Pressure* 2000; 9: 47–51.
20. Devereux RB, *et al.* Standardization of M-mode echocardiographic left ventricular anatomic measurements. *J Am Coll Cardiol* 1984; 6: 1222–30.
21. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation*. 1977; 55: 613–18.
22. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, *et al.* Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450–8.
23. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Int Med* 1916; 17: 863–71.
24. Lifton RP, *et al.* Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* 1992; 2: 66–74.
25. Davies E, *et al.* Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphism differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension* 1999; 33: 703–7.
26. Brand E, *et al.* Structural analysis of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 198–204.
27. Tsujita Y, *et al.* Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res* 2001 Mar; 24: 105–9.
28. Kurland L, *et al.* Angiotensinogen gene polymorphisms: relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. Results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) Trial. *Am J Hypertens* 2004; 17: 8–13.
29. Kurland L, *et al.* Aldosterone synthase (CYP11B2)-344C/T polymorphism is related to antihypertensive response. Results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) Trial. *Am J Hypertens* 2002; 15: 389–93.
30. Staessen JA, *et al.* Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens* 2001; 19: 1349–58.
31. Komiya I, *et al.* Lys173Arg and –344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low renin hypertension. *Hypertension* 2000; 34: 699–703.
32. Tamaki S, *et al.* Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* 1999; 33part II: 266–70.
33. Basset MH, *et al.* Differential regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 125–35.
34. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin–angiotensin–aldosterone system. *Circulation*. 1991; 83: 1849–65.
35. Kupari M, *et al.* Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and left ventricular size, mass and function. *Circulation* 1998; 97: 569–75.
36. Delles C, Erdmann J, Jacobi J, Hilgers KF. Aldosterone synthase (CYP11B2) –344 C/T polymorphism is associated with left ventricular structure in human arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 878–84.
37. Stella P, *et al.* Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 265–70.
38. Montgomery H, *et al.* Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. *Lancet* 1999; 353: 541–5.

Submitted January 23, 2004; accepted March 3, 2004

Address for correspondence:

Samuel Heller, M.D.
2nd Department of Internal Medicine
1st School of Medicine
Charles University
U Nemocnice 2
Prague 2, 128 08
Czech Republic
E-mail: shel@lf1.cuni.cz

Hlubocká Z, Jáchymová M, **Heller S**, Umnerová V, Danzig V,
Lánská V, Horký K, Linhart A

**Association of the -344T/C aldosterone synthase gene variant
with essential hypertension.**

Physiol Res 2009;**58**(6):785-92

Association of the -344T/C Aldosterone Synthase Gene Variant with Essential Hypertension

Z. HLUBOCKÁ¹, M. JÁCHYMOVÁ², S. HELLER¹, V. UMNEROVÁ¹, V. DANZIG¹, V. LÁNSKÁ³, K. HORKÝ¹, A. LINHART¹

¹Second Medical Department – Clinical Department of Cardiology and Angiology and ²Department of Biochemistry and Laboratory Methods, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, Prague, ³Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Received November 19, 2007

Accepted October 24, 2008

On-line December 17, 2008

Summary

The aldosterone synthase gene (CYP11B2) is an important candidate gene region in essential hypertension. We therefore studied the association of -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene with the presence and severity of hypertension in a case-control study. We studied 369 individuals, of whom 213 were hypertensive patients (139 controlled hypertensive, 74 resistant hypertensive) and 156 were healthy normotensive subjects. The -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene was determined using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis. The distribution of genotypes in normotensive controls and hypertensive subjects were: TT 25.6 vs. 31.9 %, TC 51.9 vs. 57.3 % and CC 22.4 vs. 10.8 %. The -344T/C variant was associated with hypertension. Subjects carrying the -344T allele had a greater risk of hypertension compared to those having C allele ($\chi^2=5.89$, $p<0.05$). The frequency of CC genotype was significantly lower in hypertensive patients than in normotensive controls ($\chi^2=9.44$, $p<0.01$). A stepwise logistic regression analysis confirmed these findings. We did not find an association of -344T/C variant with the resistance of hypertensive patients to combination therapy, but we observed an association of -344T/C polymorphism of aldosterone synthase gene with increased risk of hypertension. These results support a potential role of -344T/C CYP11B2 gene polymorphism in genetic predisposition to develop hypertension.

Key words

Aldosterone synthase • Hypertension • Polymorphism • Aldosterone

Corresponding author

Z. Hlubocká, Second Medical Department – Clinical Department of Cardiology and Angiology, First Faculty of Medicine, Charles University, U nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic.
Fax: +4202 2491 2154. E-mail: hlubockaz@seznam.cz

Introduction

The renin-angiotensin-aldosterone system is an important regulator of blood pressure and molecular variants in genes that encode components of this system have been associated with several cardiovascular diseases, such as essential hypertension, myocardial infarction and hypertrophic cardiomyopathy.

Among them the CYP11B2 gene encodes a key enzyme of the aldosterone biosynthesis – aldosterone synthase. Aldosterone is an independent risk factor for cardiovascular diseases and development of cardiac hypertrophy and fibrosis. Aldosterone synthase includes the steroid 11 β -hydroxylase, 18-hydroxylase and 18-oxidase activities that are required for the final steps of aldosterone biosynthesis. A related enzyme, 11 β -hydroxylase (CYP11B1), is responsible mainly for cortisol biosynthesis, although changes in its activity can also influence biosynthesis of steroid metabolites with mineralocorticoid actions. The two relevant genes (CYP11B2, CYP11B1) are located in a close proximity on chromosome 8q22. It is now apparent from investigation of rare monogenic forms of hypertension

and animal models that changes in the expression and activity of these enzymes can affect sodium homeostasis and thereby blood pressure through defects in mineralocorticoid metabolism. CYP11B2 is thus an obvious gene to test for association with hypertension (Brand *et al.* 1998, Freel and Connell 2004).

To date, three common genetic variants of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) have been identified as possible determinants of high blood pressure in patients with essential hypertension (White and Slutsker 1995, Mulatero *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2003). One is a single nucleotide polymorphism in the 5' promoter region at -344T/C that alters a putative recognition site for steroidogenic transcription factor-1 (SF-1). The other polymorphism involves intron 2 of CYP11B2, which is partly replaced by the corresponding intron of CYP11B1 gene. These two polymorphisms are in close linkage disequilibrium. The third polymorphism is a point mutation K173R in exon 3.

Several studies of association between -344T/C polymorphism and essential hypertension have been published, with controversial results. Whereas some have found that the T-allele is more common in hypertension and subjects with increased urinary aldosterone excretion rate (Brand *et al.* 1998, Davies *et al.* 1999, Kumar *et al.* 2003, Casiglia *et al.* 2005), others have demonstrated no association of either allele with hypertension or other cardiovascular disease (Brand *et al.* 1999, Schunkert *et al.* 1999, Kato *et al.* 2000, Tsujita *et al.* 2001). It was also suggested that the C allele may be associated with genetic predisposition to hypertension in Hani and Yi minorities in China (Tang *et al.* 2006). Several factors such as ethnicity, gender and age could be involved in the phenotypic expression of this polymorphism.

Some studies evaluated the impact of -344T/C polymorphism of the CYP11B2 on the severity of hypertension and blood pressure-lowering response to antihypertensive drugs (Kurland *et al.* 2002, Tiago *et al.* 2003). Because the severity of hypertension determines cardiovascular risk and aldosterone is an important therapeutic target in hypertension, genotyping for the -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene may have prognostic as well as therapeutic potential in hypertensive patients.

The present study was designed to investigate the association of -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene with genetic predisposition to essential hypertension. Furthermore, we examined whether this polymorphism is associated with resistance of

hypertensive patient to combined antihypertensive therapy.

Materials and Methods

Study groups and clinical assessment

We examined a total of 369 individuals, of whom 213 were patients with essential hypertension and 156 were healthy normotensive subjects. All subjects were unrelated Caucasians from the Bohemia region of the Czech Republic. Hypertensive patients were sequentially enrolled from the outpatient clinic of Second Medical Department – Clinical Department of Cardiology and Angiology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague. Hypertension was defined according to the following criteria: (i) systolic blood pressure (BP) ≥ 140 mm Hg or diastolic BP ≥ 90 mm Hg, or both, measured on two consecutive visits for untreated subjects; (ii) patients receiving long-term antihypertensive treatment; (iii) no clinical or biochemical evidence of secondary hypertension. Normotensive subjects were selected from outpatients who participated in voluntary health checks and hospital staff undergoing annual medical examinations. The subjects were considered to be normotensive when their systolic blood pressure was lower than 140 mm Hg and diastolic blood pressure below 90 mm Hg. All subjects had normal renal function and no history of diabetes, heart disease or other serious illness. Informed consent was obtained from each subject and the study was approved by the local ethic committee.

To phenotype hypertensive subjects further they were subdivided according to the severity of hypertension into two groups: patients well-controlled after adjustment of lifestyle and medication [controlled hypertension group (CH), $n=139$] and subjects resistant to combined antihypertensive therapy [resistant hypertension group (RH), $n=74$]. Hypertensive patients were considered resistant to therapy if they had systolic BP ≥ 140 mm Hg and/or diastolic BP ≥ 90 mm Hg when on a triple antihypertensive therapy including diuretics.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes according to the standard method (Miller *et al.* 1988). The -344T/C polymorphism of the CYP11B2 gene was determined by the analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Komiya *et al.* 2000) (Fig. 1). The DNA fragment containing -344T/C of the

CYP11B2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR was performed using Taq polymerase Boehringer Ingelheim and oligonucleotide primers CTCACCCAGGAACCTGCTCTGGAAACATA and CAGGAGGGATGAGCAGGCAGAGCACAG using hot start and touchdown PCR to increase specificity of the reaction. PCR was subjected to 94 °C for 30 s and from 62 °C to 58 °C, two cycles 1 °C lower temperature annealing, 72 °C for 30 s for amplification to the total amount of 35 cycles followed by final extension for 5min, producing a fragment of 639 bp. This fragment was subsequently cleaved by HaeIII, creating fragments for allele T 402, 138, 51 and 48 bp, and for allele C 334, 138, 68, 51 and 48 bp, which were subjected to electrophoresis on a metaphoragarose gel and visualized with ethidium bromide. The samples from hypertensive patients and healthy controls were also analyzed by DNA sequence analysis to confirm results of the PCR-RFLP method.

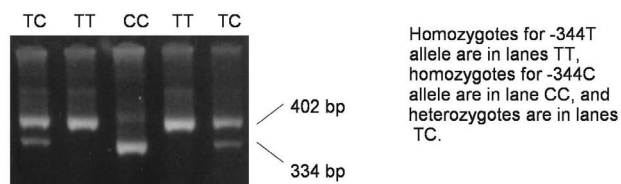


Fig. 1. Genotype determination of the -344T/C CYP11B2 gene polymorphism.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SYSTAT 10 statistical software (SPSS Inc., 2000). Data are given as means \pm S.D. Differences in clinical variables between case and control groups were tested using one-way analysis of variance (ANOVA). The Hardy-Weinberg equilibrium and allele frequency and genotype distributions were tested by χ^2 statistic (Falconer and Mackay 1996). A stepwise logistic regression analysis was conducted to adjust for covariates including age, gender, body mass index (BMI), blood glucose, serum triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol plasma levels. Association of phenotypic parameters (BP levels, age, sex, BMI) with genotype was assessed by one-way ANOVA for continuous variables and χ^2 test for discrete variables. All statistical tests were two-tailed and values of $p < 0.05$ were considered to represent statistically significant differences.

Results

Clinical characteristics of the study groups

The overall characteristics of the study subjects genotyped for the -344T/C CYP11B2 gene polymorphism are listed in Table 1. Systolic and diastolic blood pressure was markedly higher in patients with essential hypertension (H group) than in normotensive

Table 1. Clinical characteristics of the study groups.

	Normotensive subjects	Hypertensive subjects n = 213		p (ANOVA)
		Controlled hypertensive	Resistant hypertensive	
n	156	139	74	
Age (years)	51.3 \pm 9.7	56.6 \pm 10.5*	61.4 \pm 8.74*	p<0.001
Systolic BP (mmHg)	122 \pm 10.4	144 \pm 16.9*	152 \pm 16.1*	p<0.001
Diastolic BP (mmHg)	79.6 \pm 6.45	90.1 \pm 8.61*	95.3 \pm 8.27*	p<0.001
BMI (kg/m ²)	26.1 \pm 3.41	28.5 \pm 4.37*	29.8 \pm 3.79*	p<0.001
Fasting glucose (mmol/l)	5.29 \pm 0.73	5.98 \pm 1.74*	6.36 \pm 2.27*	p<0.001
Serum-total cholesterol (mmol/l)	5.43 \pm 0.94	5.45 \pm 1.16	5.19 \pm 0.94	n.s.
Triglycerides (mmol/l)	1.43 \pm 0.94	1.87 \pm 1.22*	1.87 \pm 0.84*	p<0.01
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.40 \pm 0.30	1.29 \pm 0.31*	1.23 \pm 0.30*	p<0.01
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.39 \pm 0.77	3.36 \pm 0.91	3.11 \pm 0.81	n.s.

Data are expressed as means \pm S.D., * $p < 0.05$ for controlled hypertensives, resistant hypertensives versus normotensives by one-way ANOVA. BP = blood pressure, BMI = body mass index, HDL = high density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, n.s. = not significant, ANOVA = analysis of variance.

group (N group). In addition, as expected, body mass index (BMI) and fasting blood glucose were significantly higher in H group than in N group. No significant differences were detected between groups with respect to height, total cholesterol and LDL-cholesterol levels. Plasma levels of LDL-cholesterol revealed a non-significant tendency to lower concentrations in hypertensive than in normotensive subjects. This finding corresponds to a significant number of hypertensive patients treated by statin therapy. However, serum triglycerides were higher and serum HDL cholesterol was lower in hypertensive than in normotensive group.

Table 2. Association analysis of -344T/C CYP11B2 gene polymorphism in hypertensives versus normotensives.

Genotype frequencies (n, %)				
Group (n)	TT (n=108)	TC (n=203)	CC (n=58)	p
Normotensive subjects	40 (37.0 %)	81 (39.9 %)	35 (60.3 %)	p<0.01 $\chi^2=9.44$
Hypertensive patients	68 (63.0 %)	122 (60.1 %)	23 (39.7 %)	

Allele frequencies (n, %)			
Group (n)	T (n=419)	C (n=319)	p
Normotensive subjects	161(38.4 %)	151(47.3 %)	p<0.05 $\chi^2=5.89$
Hypertensive patients	258 (61.6 %)	168 (52.7 %)	

Genotypes and alleles indicated as percentage and number. Statistical analysis by χ^2 test.

Association between aldosterone synthase variants and essential hypertension

Table 2 shows the distribution of genotypes and alleles for the -344T/C CYP11B2 gene polymorphism in hypertensive subjects and normotensive controls.

Frequencies of genotypes were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium in normotensive group. On the contrary the observed genotype frequencies deviated from that expected from the Hardy-Weinberg equilibrium in hypertensive group (p<0.01).

We found a significant association of the -344T/C CYP11B2 gene polymorphism with essential hypertension. Subjects carrying the -344T allele had

significantly greater risk of essential hypertension compared with those carrying C allele. The CC genotype was twice as prevalent in the normotensive as in hypertensive patients (Table 2). In the logistic regression analysis we observed significant association of -344T/C aldosterone synthase gene polymorphism and hypertension (TC vs. CC: odds ratio = 3.4, 95 % confidence interval 1.3-9.1; TT vs. CC: odds ratio = 5.4, 95 % confidence interval 1.8-16) after adjustment for the covariates of age, gender, BMI, blood glucose and blood lipid levels. We failed to observe any significant difference in the genotype distribution or allele frequencies between hypertensive subjects well-controlled with antihypertensive therapy (CH group) and resistant hypertensive group (RH group) either by χ^2 statistics or logistic regression analysis.

The associations between phenotypic characteristics and aldosterone synthase genotype were analyzed for the normotensive and hypertensive groups separately, as well as in the combined group of normotensive and hypertensive subjects. One-way ANOVA analysis did not show a significant influence of genotype on systolic or diastolic BP. Finally, no significant differences in terms of gender distribution, age, body mass index, glucose and cholesterol concentrations were detected among the genotypes.

Discussion

In the present study, we investigated the association between the -344T/C polymorphism in the promoter region of the human CYP11B2 gene and essential hypertension. Our results showed that the genotype and allele distribution differed significantly between hypertensive and normotensive groups. The -344T allele and TT genotype were associated with genetic predisposition to develop hypertension.

A number of studies have suggested the implication of CYP11B2 gene polymorphism in the pathogenesis of cardiovascular disease. However, previous data on the association between the -344T/C polymorphism and hypertension or with hypertensive intermediate phenotypes such as plasma renin activity and plasma aldosterone concentration gave controversial results. Our findings are in agreement with several studies previously conducted in Caucasians, also showing association of -344T allele with hypertension or blood pressure levels (Brand *et al.* 1998, Davies *et al.* 1999, Casiglia *et al.* 2005). At variance with these

reports, other studies conducted in Caucasian populations did not find any association (Brand *et al.* 1999, Schunkert *et al.* 1999). Kumar *et al.* (2003) reported that the C allele was associated with hypertension in Caucasian women. No association between the T allele and hypertension has also been reported in several Japanese studies (Kato *et al.* 2000, Tsujita *et al.* 2001, Isaji *et al.* 2005) and in one of them hypertension was associated with the C allele (Tamaki *et al.* 1999). Similar inconsistencies have characterized the reports linking this polymorphism to plasma or urinary aldosterone levels (Brand *et al.* 1998, Davies *et al.* 1999, Connell *et al.* 2004). Several reasons could account for these inconsistent results. First, the associations could be influenced by the different genetic background and environmental factors in geographically separated populations. Furthermore, the differences in study design and selection criteria, such as different age (Casiglia *et al.* 2005), gender (Tsujita *et al.* 2001) or different proportions of individuals with low renin hypertension (Zhu *et al.* 2003) might be responsible for these discrepancies. In a recent meta-analysis Sookoian *et al.* (2007) showed that subjects homozygous for the -344T allele of the CYP11B2 gene have, at least, a 17 % greater risk of essential hypertension than their -344CC counterparts.

The exact mechanism, whereby the -344T/C polymorphism of CYP11B2 gene variant may lead to higher blood pressure remains unknown. Recent studies suggest that the -344T/C variant by itself does not directly influence promoter activity despite its location within a SF-1 binding site. Rather, binding of SF-1 to this site downregulates activity of CYP11B2 promoter by making SF-1 less available to functionally affect other CYP11B2 promoter sites, which could alter expression of the gene (Clyne *et al.* 1997). Moreover, *in vitro* studies showed that C allele binds SF-1 fourfold more strongly than it does the T allele (White and Slutsker 1995). This may allow a change in CYP11B2 promoter activity and expression (Hautanen *et al.* 1998, Matsubara *et al.* 2004).

In a previous study conducted in normotensive healthy men we observed higher plasma renin activity (PRA) in TT homozygotes and higher values of left ventricular mass index in individuals with TT genotype and high PRA (Heller *et al.* 2004). In agreement with these findings a recent meta-analysis also revealed higher PRA and no difference in plasma aldosterone levels in homozygous TT individuals (Sookoian *et al.* 2007). We may speculate that higher PRA reported in TT homozygous individuals may be adaptive to a lack of

adequate response of the CYP11B2 promoter bearing the T allele to the angiotensin II-mediated stimulus. Therefore the elevated plasma angiotensin II may make TT homozygous subjects more prone to hypertension (Heller *et al.* 2004, Sookoian *et al.* 2007, Staessen *et al.* 2007).

The evaluation of hypertensive patients selected according to the severity of hypertension may increase the genetic component of hypertension and thus improve the likelihood of detecting any existing genetic association with hypertension. Studies conducted in hypertensive patients that examined the relationship between candidate gene polymorphisms and the severity of hypertension or presence of resistant hypertension has provided contradictory data. While some studies have reported an association of -344T/C polymorphism of aldosterone synthase gene, I/D polymorphism of ACE gene, A1166C polymorphism of AT1-receptor gene and G894T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with severity of BP changes, resistant hypertension, malignant hypertension or hypertensive crisis, others did not confirm these results (Brand *et al.* 1998, O'Donnell *et al.* 1998, Stefansson *et al.* 2000, Jáchymová *et al.* 2001, Sunder-Plassmann *et al.* 2002, Tiago *et al.* 2003). In the present study we evaluated the impact of -344T/C polymorphism of CYP11B2 gene on the severity of hypertension by comparing hypertensive subjects well-controlled by conventional therapy and patients with resistant hypertension. We did not observe association between CYP11B2 genotype groups and presence of resistant hypertension. We found high frequency of resistant hypertension in our study. Although the prevalence of resistant hypertension is unknown, the data from recent hypertension outcome trials (VALUE, ALLHAT, CONVINCE) indicate that it is greater than previously thought (Cushman *et al.* 2002, Black *et al.* 2003, Julius *et al.* 2003). On the other hand, patients enrolled in hypertension clinic of our hospital are generally those with moderate to severe or uncontrolled hypertension. Thus, we think that the number of patients with resistant hypertension in our study overestimates the occurrence of resistant hypertension in hypertensive population.

Several studies investigating the role of -344T/C aldosterone synthase gene polymorphism on blood pressure described an association of BP levels with -344T allele (Brand *et al.* 1998, Brand *et al.* 1999, Matsubara *et al.* 2001, Tiago *et al.* 2003, Barbato *et al.* 2004). However, in the study of Brand *et al.* (1998) the

relationship was significant only in the subgroup of severely hypertensive patients of African ethnicity with BMI greater than 27 kg/m². In contrast, other cross-sectional and case-control studies as well as the meta-analysis by Sookoian *et al.* (2007) did not confirm the role of aldosterone synthase gene polymorphism in determining BP levels (Brand *et al.* 1998, Brand *et al.* 1999, Kupari *et al.* 1998, Tsujita *et al.* 2001, Tiago *et al.* 2003). In our study, we did not demonstrate the influence of genotype on systolic and diastolic BP levels. However, since we were unable to discontinue therapy in our outpatients, and the assessment of pretreatment blood pressure levels was not available, such analysis is inevitably biased. The genetic effects on BP levels in our study population may have been modified by the antihypertensive medication. Finally, we did not observe any significant differences among the genotypes in terms of gender distribution, age, BMI, glucose and cholesterol

concentrations.

In summary, we have observed an association of -344T/C polymorphism of aldosterone synthase gene with hypertension in case-control study in Caucasian subjects from Czech Republic. These results support a potential role of -344T/C CYP11B2 gene polymorphism in mechanisms affecting blood pressure regulation. Further studies of this locus should be performed in large-scale populations to confirm our results and to define the underlying physiological and clinical implications of observed association.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

Study supported by the research project from the Ministry of Health of the Czech Republic (MZO VFN2005).

References

- BARBATO A, RUSSO P, SIANI A, FOLKERD EJ, MILLER MA, VENEZIA A, GRIMALDI C, STRAZZULLO P, CAPPUCCIO FP: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J Hypertens* **22**: 1895-1901, 2004.
- BLACK HR, ELLIOTT WJ, GRANDITS G, GRAMBSCH P, LUCENTE T, WHITE WB, NEATON JD, GRIMM RH JR, HANSSON L, LACOURCIERE Y, MULLER J, SLEIGHT P, WEBER MA, WILLIAMS G, WITTES J, ZANCHETTI A, ANDERS RJ; CONVINCE RESEARCH GROUP: Principal results of the controlled onset verapamil investigation of cardiovascular end points (CONVINCE) trial. *JAMA* **289**: 2073-2082, 2003.
- BRAND E, CHATELAIN N, MULATERO P, FERY I, CURNOW K, JEUNEMAITRE X, CORVOL P, PASCOE L, SOUBRIER F: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* **32**: 198-204, 1998.
- BRAND E, SCHODE U, RINGEL J, BRITE J, DISTLER A, SHARMA AM: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphism in Caucasians from the Berlin Salt-Sensitive Trial (BeSST). *J Hypertens* **17**: 1563-1567, 1999.
- CASIGLIA E, TIKHONOFF V, MAZZA A, RYNKIEWICZ A, LIMON J, CAFFI S, GUGLIELMI F, MARTINI B, BASSO G, WINNICKI M, PESSINA AC, SOMERS VK: C-344T polymorphism of the aldosterone synthase gene and blood pressure in the elderly: a population-based study. *J Hypertens* **23**: 1991-1996, 2005.
- CLYNE CD, ZHANG Y, SLUTSKER L, MATHIS JM, WHITE PC, RAINEY WE: Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol Endocrinol* **11**: 638-649, 1997.
- CONNELL JM, FRASER R, MACKENZIE SM, FRIEL EC, INGRAM MC, HOLLOWAY CD, DAVIES E: The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation. *Mol Cell Endocrinol* **217**: 243-247, 2004.
- CUSHMAN WC, FORD CE, CUTLER JA, MARGOLIS KL, DAVIS BR, GRIMM RH, BLACK HR, HAMILTON BP, HOLLAND J, NWACHUKU C, PAPADEMETRIOU V, PROBSTFIELD J, WRIGHT JT JR, ALDERMAN MH, WEISS RJ, PILLER L, BETTENCOURT J, WALSH SM, ALLHAT COLLABORATIVE RESEARCH GROUP: Success and predictors of blood pressure control in diverse North American settings: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *J Clin Hypertens* **4**: 393-404, 2002.

- DAVIES E, HOLLOWAY CD, INGRAM MC, INGLIS GC, FRIEL EC, MORRISON C, ANDERSON NH, FRASER R, CONNELL JM: Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension* **33**: 703-707, 1999.
- FALCONER DS, MACKAY FC: *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Group Ltd, London, 1996.
- FREEL EM, CONNELL JM: Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* **15**: 1993-2001, 2004.
- HAUTANEN A, LANKIEN L, KAPUCI M, JANNE OA, ADLERCREUTZ H, NIKKILA H, WHITE PC: Associations between aldosterone synthase gene polymorphism and adrenocortical function in males. *J Intern Med* **244**: 11-18, 1998.
- HELLER S, LINHART A, JINDRA A, JÁCHYMOVÁ M, HORKÝ K, PELEŠKA J, HLUBOCKÁ Z, UMNEROVÁ V, ASCHERMANN M: Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men. *Blood Press* **13**: 158-163, 2004.
- ISAJI M, MUNE T, TAKADA N, YAMAMOTO Y, SUWA T, MERITA H, TAKEDA J, WHITE PC: Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2. *J Hypertens* **23**: 1149-1157, 2005.
- JÁCHYMOVÁ M, HORKÝ K, BULTAS J, KOŽICH V, JINDRA A, PELEŠKA J, MARTÁSEK P: Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 426-430, 2001.
- JULIUS S, KJELDSSEN SE, BRUNNER H, HANSSON L, PLATT F, EKMAN S, LARAGH JH, MCINNES G, SCHORK AM, SMITH B, WEBER M, ZANCHETTI A; VALUE TRIAL: VALUE trial: long-term blood pressure trends in 13,449 patients with hypertension and high cardiovascular risk. *Am J Hypertens* **16**: 544-548, 2003.
- KATO N, SUGIYAMA T, MERITA H, KURIHARA H, FURUKAWA T, ISSHIKI T, SATO T, YAMORI Y, YAZAKI Y: Comprehensive analysis of the renin-angiotensin gene polymorphisms with relation to hypertension in the Japanese. *J Hypertens* **18**: 1025-1032, 2004.
- KOMIYA I, YAMADA T, TAKARA M, ASAWA T, SHIMABUKURO M, NISHIMORI T, TAKASU N: Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. *Hypertension* **35**: 699-703, 2000.
- KUMAR NN, BENJAFIELD AV, LIN RC, WANG WY, STOWASSER M, MORFIA BJ: Haplotype analysis of aldosterone synthase gene CYP11B2 polymorphism shows association with essential hypertension. *J Hypertens* **21**: 1331-1337, 2003.
- KUPARI M, HAUTANEN A, LANKIEN L, KOSKINEN P, VIROLAINEN J, NIKKILA H, WHITE PC: Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* **97**: 569-575, 1998.
- KURLAND L, MELHUS H, KARLSSON J, KAHAN T, MALMQVIST K, LIND L: Aldosterone synthase (CYP11B2) -344C/T polymorphism is related to antihypertensive response: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens* **15**: 389-393, 2002.
- MATSUBARA M, KIKUYA M, OHKUBO T, METOKI H, OMORI F, FUJIWARA T, SUZUKI M: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study. *J Hypertens* **19**: 2179-2184, 2001.
- MATSUBARA M, SATO T, NISHIMURA T, SUZUKI M, KIKUYA M, METOKI H, MICHIMATA M, TSUJI I, OGIHARA T, IMAI Y: CYP11B2 polymorphisms and home blood pressure in a population-based cohort in Japanese: the Ohasama Study. *Hypertens Res* **27**: 1-6, 2004.
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF: A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215, 1988.
- MULATERO P, SCHIAVONE D, FALLO F, RABBIA F, VEGLIO F: CYP11B2 gene polymorphisms in idiopathic hyperaldosteronism. *Hypertension* **35**: 694-698, 2000.

- O'DONNELL CK, LINDPAINTNER K, LARSON MG, RAO VS, ORDOVAS JM, SCHAEFER EJ, MYERS RH, LEVY D: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* **97**: 1766-1772, 1998.
- SCHUNKERT H, HENGSTENBERG C, HOLME SR, BROECKEL U, LUCHNER A, MUSCHOLL MW, KURZINGER S, DORING A, HENSE HW, RIEGGER GA: Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation* **99**: 2255-2260, 1999.
- SOOKOIAN S, GIANOTTI TF, GONZALEZ CD, PIROLA CJ: Association of the C-344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens* **25**: 5-13, 2007.
- STAESSEN JA, LI Y, THIJS L: Meta-analysis of blood pressure and the CYP11B2 polymorphism highlights the need for better designed studies. *J Hypertens* **25**: 37-39, 2007.
- STEFANSSON B, RICKSTEN A, RYMO L, AURELL M, HERLITZ H: Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in malignant hypertension. *Blood Press* **9**: 104-109, 2000.
- SUNDER-PLASSMANNG, KITTLER H, BERLE C, HIRSCHL MM, WOISETSCHAGER CH, DERHASCHNIG U, LAGGNER AN, HORL WH, FODINGER M: Angiotensin converting enzyme DD genotype is associated with hypertension crisis. *Crit Care Med* **30**: 2236-2241, 2002.
- TAMAKI S, IWAI N, TSUJITA Y, KINOSHITA M: Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* **33**: 266-270, 1999.
- TANG W, WU H, ZHOU X, CHEBY B, DONG Y, HE L, YU H, XU L, LU J, LI K, XIAO CH: Association of the C-344T polymorphism of CYP11B2 gene with essential hypertension in Hani and Yi minorities of China. *Clin Chim Acta* **364**: 222-225, 2006.
- TIAGO AD, BADENHORST D, NKEH B, CANDY GP, BROOKSBANK R, SARELI P, LIBHABER E, SAMANI NJ, WOODIWISS AJ, NORTON GR: Impact of renin-angiotensin-aldosterone system gene variants on the severity of hypertension in patients with newly diagnosed hypertension. *Am J Hypertens* **16**: 1006-1010, 2003.
- TSUJITA Y, IWAI N, KATSUYA T, GIGAMI J, OGIHARA T, TAMAKI S, KINOSHITA M, MANNAMI T, OGATA J, BABA S: Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res* **24**: 105-109, 2001.
- WHITE PC, SLUTSKER L: Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* **21**: 437-42, 1995.
- ZHU H, SAGNELLA GA, DONG Y, MILLER MA, ONIPINLA A, MAKANDU ND, MACGREGOR GA: Contrasting associations between aldosterone synthase gene polymorphisms and essential hypertension in blacks and in whites. *J Hypertens* **21**: 87-95, 2003.
-

Linhart A, Sedláček K, Jáchymová M, Jindra A, Beran S,
Vondráček V, **Heller S**, Horký K.

**Lack of association of angiotensin-converting enzyme and
angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular
structure in young normotensive men.**

Blood Press 2000;**9**(1):47-51

Lack of Association of Angiotensin-converting Enzyme and Angiotensinogen Genes Polymorphisms with Left Ventricular Structure in Young Normotensive Men

ALEŠ LINHART, KAMIL SEDLÁČEK, MARIE JÁCHYMOVÁ, ANTONÍN JINDRA, STANISLAV BERAN, VLADIMÍR VONDRÁČEK, SAMUEL HELLER AND KAREL HORKÝ

From the 2nd Department of Internal Medicine, 1st School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Linhart A, Sedláček K, Jáchymová M, Jindra A, Beran S, Vondráček V, Heller S, Horký K. *Lack of association between angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men.* Blood Pressure 2000; 9: 47–51.

Left ventricular (LV) hypertrophy is a strong predictive factor for cardiovascular morbidity and mortality. LV structure and function are influenced by many variables, including genetic background. The potential role of gene polymorphisms of different components of the renin angiotensin system remains controversial. The aim of this study was to determine the influence of deletion/insertion (D/I) polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and M235→T polymorphism of the angiotensinogen (AG) gene on left ventricular morphology and function in young normotensive men. The study included 110 normotensive healthy males (mean age 24 ± 4 years, age range 18 to 34 years) who were assessed by echocardiography for LV structure and function. In all subjects ACE D/I polymorphism was evaluated using a polymerase chain reaction (PCR) method. M235→T polymorphism assessment was available in 98 individuals. Significant differences between groups according to ACE I/D or AG M235→T polymorphisms were not found for parameters of LV morphology or for parameters of systolic and diastolic function. When subjects with DD or ID genotypes were grouped, their LV mass index was higher than that in subjects with II genotypes (86 ± 14 vs 79 ± 15 , $r^2 = 0.033$, $p = 0.05$). There were no significant differences among other variables. In a population of young normotensive men where the influence of confounding variables such as age, gender and associated pathological conditions is minimized, the gene polymorphisms of ACE I/D and AG M235→T are not important determinants of LV structure and function. **Key words:** *angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, echocardiography, gene polymorphisms, left ventricular function, left ventricular mass.*

INTRODUCTION

Increased left ventricular (LV) mass is an independent predictor of cardiovascular morbidity and mortality [1, 2]. The genetic control of different mechanisms that regulate myocardial growth and function is poorly understood. Despite recognition that the renin-angiotensin system plays an important role in the development of LV hypertrophy, the influence of different known polymorphisms of components of this system is less clear. Controversial reports have been published concerning the influence of angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism on left ventricular hypertrophy. Several studies suggest an independent association of DD genotype with LV mass increase and remodeling in systemic hypertension [3–5], after myocardial infarction [6], in response to physical training [7] and treatment with ACE inhibitors [8]. However, other authors were unable to confirm these findings. Despite persisting controversy [9], the D allele of the ACE gene seems to be associated with a higher risk of cardiovascular adverse events [10].

Angiotensinogen gene (AG) polymorphism is perhaps less important in LV adaptation in hypertension [11]. What is more, its influence on LV structural changes in hypertrophic cardiomyopathy was not detectable [12, 13]. On the other hand, there are many reports suggesting the association of AG polymorphism with arterial hypertension [14, 15], recently confirmed by a detailed meta-analysis by Staessen *et al.* [16]. However, M235→T polymorphism does not seem to be associated with cardiovascular end-organ damage [16].

Our study was designed to assess the role of ACE gene I/D and AG gene M235→T polymorphisms on LV function and structure in a homogeneous population of young, normotensive healthy men recruited from families participating in a large population survey conducted in our department.

METHODS

Study population

Subjects included in the present study were the offspring of patients participating in a large, population-based

Table I. Principal clinical characteristics of study participants according to ACE and AG genes polymorphism. Data are means \pm SD

	ACE polymorphism			Angiotensinogen polymorphism		
	DD	ID	II	MM	MT	TT
<i>n</i>	25	61	24	28	50	20
Age (years)	24 \pm 5	25 \pm 4	25 \pm 4	25 \pm 5	25 \pm 4	25 \pm 5
Height (cm)	181 \pm 5	181 \pm 6	181 \pm 6	182 \pm 6	180 \pm 6	183 \pm 5
Weight (kg)	74 \pm 10	76 \pm 11	76 \pm 9	76 \pm 10	76 \pm 11	78 \pm 10
BSA (m ²)	1.94 \pm 0.13	1.96 \pm 0.15	1.96 \pm 0.12	1.97 \pm 0.14	1.94 \pm 0.14	2.00 \pm 0.12
BMI (kg/m ²)	22.6 \pm 2.6	23.2 \pm 2.8	23.4 \pm 2.6	22.9 \pm 2.7	23.3 \pm 2.9	23.3 \pm 2.7
Blood pressure (mmHg)						
Systolic	120 \pm 9	118 \pm 11	119 \pm 13	118 \pm 13	117 \pm 11	120 \pm 7
Diastolic	79 \pm 9	78 \pm 7	79 \pm 7	78 \pm 6	80 \pm 8	78 \pm 9
Heart rate (b/m)	69 \pm 11	65 \pm 11	64 \pm 9	64 \pm 9	65 \pm 12	64 \pm 8

longitudinal study, conducted for almost 20 years in our department [17]. As part of the study, 209 Caucasian normotensive men without any clinically apparent metabolic and cardiovascular disease were screened in order to evaluate early metabolic, hormonal and cardiovascular structural changes related to genetic influences and family history of cardiovascular diseases. The population was chosen to avoid any misleading influence of the subjects' gender, age and associated pathological conditions. Of these 209 subjects, 118 men, 35 years of age and younger, gave their consent and underwent detailed echocardiographic examination and DNA analysis. Five overweight subjects (BMI > 30 kg/m²) and 3 subjects with asymmetric septal hypertrophy were excluded in order to minimize the influence of excessive obesity on LV structure and to exclude cases with suspected hypertrophic cardiomyopathy, respectively, which left an analysis population of 110 men. ACE polymorphism was evaluated in all study participants. For technical reasons, AG polymorphism results were available for 98 individuals only.

Echocardiography

The echocardiographic evaluation was performed by two skilled operators (A. L. and V. V.) using a Toshiba 160 SSH-A echocardiographic machine with a 2.5 MHz-phased array probe. In all subjects thickness and diameters were measured according to the recommendations of the American Society of Echocardiography [18, 19] on the M-mode recording. The following parameters were measured: interventricular septum (IVSd), posterior wall (PWd) and internal LV diameter (LVd). Left atrial diameter (LA) was measured at the moment of aortic valve closure. All measurements were performed on-line at least three times and averaged. The asymmetric septal hypertrophy was defined as a presence of

IVSd > 13 mm and IVSd: PWd ratio > 1.5. Left ventricular mass was calculated according to the Devereux-modified ACE cube formula [20] and indexed to body surface area (BSA) [21]. Ejection fraction (EF) was calculated using the single-plane, area-length method from an apical 4-chamber view. Doppler parameters of transmitral filling were recorded using pulsed-wave mode with sample volume located at the level of the tips of the mitral valve leaflets. Peak E and A velocities were measured and the E/A ratio calculated [22].

Polymorphism assessment

DNA genomic material from all of the study participants was isolated from leukocytes. The I/D polymorphism in the ACE gene was studied using the polymerase chain reaction (PCR) technique [23, 24] and PCR products were separated by agarose gel electrophoresis. Three different PCR products represent three different genotypes. DD homozygotes have one fragment of 190 bp, II homozygotes have one fragment of 490 bp and DI heterozygotes have fragments of both sizes.

For detection of the M235→T variant of the AG gene, we introduced a part of Tth 111 I restriction site by the changing of T to C. Construction of primers, PCR conditions and detection of resulting DNA fragments were performed according to Russ *et al.* [25]. The M235 allele is designated as "M" and the MM genotype was detected as a 165 bp band. The T235 allele was designated as T and the TT genotype was detected as a 141 bp band. MT genotype contained both bands.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using JMP statistical software (SAS Institute Inc.). Group data are expressed as means \pm SD. Differences between multiple groups were tested using analysis of variance and differences between

Table II. Principal echocardiographic parameters according to ACE and AG genes polymorphism. Data are means \pm SD

	ACE polymorphism			Angiotensinogen polymorphism		
	DD	ID	II	TT	MT	MM
IVSd (mm)	9.2 \pm 1.6	9.1 \pm 1.3	8.7 \pm 1.3	9.1 \pm 1.3	9.2 \pm 1.3	9.6 \pm 1.4
LVd (mm)	53.2 \pm 3.2	53.9 \pm 4.0	52.2 \pm 3.6	53.3 \pm 3.0	53.5 \pm 4.9	53.5 \pm 3.0
PWd (mm)	7.8 \pm 1.4	8.0 \pm 1.0	8.0 \pm 0.8	8.1 \pm 1.1	7.9 \pm 1.1	8.2 \pm 0.9
LVM (mm)	165 \pm 41	169 \pm 33	155 \pm 31	168 \pm 30	168 \pm 36	176 \pm 33
LVMi (g/m ²)	85 \pm 18	86 \pm 14	79 \pm 15	85 \pm 15	86 \pm 15	88 \pm 16
RWT	0.30 \pm 0.06	0.30 \pm 0.04	0.31 \pm 0.04	0.31 \pm 0.05	0.30 \pm 0.05	0.31 \pm 0.04
EF (%)	64 \pm 6	62 \pm 6	62 \pm 7	61 \pm 7	63 \pm 6	63 \pm 6
LA (mm)	35.7 \pm 4.0	35.3 \pm 4.3	36.0 \pm 4.2	35.8 \pm 3.8	35.2 \pm 4.8	35.6 \pm 2.9
E (m/s)	0.80 \pm 0.13	0.87 \pm 0.15	0.87 \pm 0.16	0.91 \pm 0.15	0.85 \pm 0.16	0.84 \pm 0.19
A (m/s)	0.46 \pm 0.10	0.48 \pm 0.15	0.44 \pm 0.09	0.49 \pm 0.15	0.45 \pm 0.11	0.51 \pm 0.14
E/A	1.84 \pm 0.55	1.97 \pm 0.67	2.00 \pm 0.48	1.99 \pm 0.62	2.00 \pm 0.62	1.74 \pm 0.61

two groups using the unpaired Student's *t*-test. A statistically significant result was considered as $p < 0.05$.

RESULTS

The principal characteristics of the study participants are summarized in Table I, according to gene polymorphisms. Between groups there were no significant differences in any anthropometric and basal hemodynamic parameters.

Echocardiographic parameters are listed in Table II. No significant differences between groups according to different polymorphism types were found, either for parameters of LV morphology or for parameters of systolic and diastolic function. When subjects with DD or ID genotypes were grouped, their LV mass index was higher than that in subjects with II genotypes (86 ± 14 vs 79 ± 15 , $r^2 = 0.033$, $p = 0.05$). There were no significant differences between other variables, even when TT and TM subgroups were grouped and compared against the MM subgroup.

DISCUSSION

The renin-angiotensin system plays an important role in sodium and water homeostasis and blood pressure level regulation. Its increased activity can therefore induce cardiac hypertrophy by volume and/or pressure overload. Furthermore, local tissue activity of angiotensin II also promotes vascular and cardiac growth [26]. The importance of the renin-angiotensin system has been underlined by studies demonstrating the efficacy of ACE inhibitors in reversing LV hypertrophy [27–29]. However, LV mass has multiple determinants, such as body size, blood pressure or volume load [30]. The influence of genetic factors in the development of non-familial forms of LV hypertrophy remains unclear. Many studies have demonstrated higher LV mass in the offspring of

hypertensive parents [31–33] and several recent reports have suggested the involvement of polymorphisms of renin-angiotensin system components [3–5, 7, 8, 34]. In contrast to these reports, we did not confirm a strong association between echocardiographically determined LV structure and function either with I/D polymorphism of the ACE gene or with M235→T AG gene polymorphism.

The lack of stronger association between ACE I/D polymorphism and LV mass is in agreement with findings in a large population from the Framingham Heart Study [35]. Likewise, the study of LV mass response to physical training in military recruits did not show a significant influence of ACE polymorphism at the baseline [7]. The negative result was further found in several other studies [36]. However, it seems that I/D polymorphism is an important determinant of LV mass under pathological conditions, such as hypertension [37, 38]. The influence of I/D polymorphism becomes apparent also in response to different conditions such as LV growth induced by physical training [7] or LV hypertrophy regression after treatment with ACE-inhibitors [8]. However, as shown by Celentano *et al.*, the influence of I/D polymorphism on LV structure in hypertension is almost completely masked by the presence of other cardiovascular risk factors [39]. The only significant finding in our study was a slightly lower LV mass index in subjects with II genotype compared with subjects with D allele in their genotype. Marginally significant, this observation is in agreement with findings in systemic hypertension, where D allele of ACE polymorphism also contributed to only 3–4% of the variation in the LV mass index [3].

The AG polymorphism association with LV structure has been subject to less investigation than ACE polymorphism. It was demonstrated, that the presence of TT genotype was a risk factor for development of hypertension [14, 15, 40, 41]. This remains a subject of

controversy, as in other reports this association was not confirmed [42–46]. Nevertheless, the meta-analysis by Staessen *et al.* demonstrated, at least in a Caucasian population, that the M235→T polymorphism is a marker of hypertension [16]. Our results are in agreement with previous reports of the lack of influence of M235→T genotype on LV structure [11]. However, in a recent report by Karjalainen *et al.*, the M235→T polymorphism predicted LV mass in endurance athletes [47].

We have to admit several limitations of the present study. The relatively small size of the studied sample limited the statistical power of the analysis and did not allow for assessment of interaction of studied polymorphisms. Echocardiography used for LV mass assessment is known to have a limited reproducibility. However, subjects with conditions that worsen the precision of LV mass assessment by echocardiography (overweight, asymmetric septal hypertrophy, wall asynergy) were excluded a priori. Moreover, the influence of several major determinants of LV mass evaluated by echocardiography is readily detectable in smaller population samples. Owing to the transverse character of our study, we were not able to apply a stimulus-activating expression of different genetically determined regulatory systems, including the renin-angiotensin cascade. Under stimuli such as physical exercise, used by Montgomery *et al.* [7] in I/D polymorphism and by Karjalainen *et al.* in M235→T polymorphism [47], the influence of studied polymorphisms may become apparent.

Our study specifically involved normotensive males up to the age of 35 years without evidence of metabolic or cardiovascular disorder. The selection of such a population precludes the influence of confounding variables such as age, gender and associated pathological conditions. In these men, only small, if any, cardiac muscle growth in response to the stimuli-activating renin-angiotensin system can be expected. Under such conditions, ACE I/D and AG M235→T polymorphisms are not important determinants of LV structure and function.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic (GAČR) Nos 306/97/0521 and KP 204/98/K015.

REFERENCES

1. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1561–6.
2. Casale PN, Devereux RB, Milner M, *et al.* Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Int Med* 1986; 105: 173–8.
3. Gharavi AG, Lipkowitz MS, Diamond JA, Jhang JS, Phillips RA. Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is independently associated with left ventricular mass and geometric remodeling in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1315–19.
4. Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, *et al.* Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634–38.
5. Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita N. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for LV hypertrophy. *Circulation* 1994; 90: 2622–28.
6. Ohmichi N, Iwai N, Maeda K, *et al.* Genetic basis of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1996; 53: 265–72.
7. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, *et al.* Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 1997; 96: 741–7.
8. Sasaki M, Oki T, Iuchi A, *et al.* Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens* 1996; 14: 1403–8.
9. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, *et al.* Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997; 99: 66–73.
10. Ludwig EH, Borecki IB, Ellison RC, *et al.* Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 1, 3–12.
11. Fernández LP, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert L. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in essential hypertension: relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 1998; 11: 439–44.
12. Yamada Y, Ichihara S, Fujimori T, Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 1997; 10: 921–8.
13. Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, *et al.* Angiotensinogen polymorphisms in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1997; 16: 829–33.
14. Johnson AG, Simons LA, Friedlander Y, Simons J, Davis DR, McCallum J. M235→T polymorphism of the angiotensinogen gene predicts hypertension in the elderly. *J Hypertens* 1996; 14: 1061–5.
15. Jeunemaitre X, Soubrier F, Koeletsev YW, *et al.* Molecular basis of human hypertension. Role of AGT. *Cell* 1992; 71: 169–80.
16. Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17: 9–17.
17. Horký K, Jáchymová M, Jindra A, *et al.* Metabolic, humoral and hemodynamic characteristics of normotensive offsprings from hypertensive families. *J Human Hypertension* 1996; 10 (Suppl 3): S 85–7.
18. Devereux RB, Lutas EM, Casale P, *et al.* Standardization of M-mode echocardiographic left ventricular anatomic measurements. *J Am Coll Cardiol* 1984; 6: 1222–30.

19. Devereux RB, Liebson PR, Horan MJ. Recommendations concerning use of echocardiography in hypertension and general population research. *Hypertension* 1987; 9 (Suppl II): II-97-II-104.
20. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, *et al.* Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450-8.
21. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximative surface area if height and weight be known. *Arch Int Med* 1916; 17: 863-71.
22. De Maria A, Wiesenbaugh TW, Smith MD, Harrison MR, Berk MR. Doppler echocardiographic evaluation of diastolic dysfunction. *Circulation* 1991; 84 (Suppl I): I-228-I-295.
23. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the I/D polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1-dipeptidyl carboxipeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1433.
24. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl: Cold Spring Harbor Laboratory*, 1993; 3: 120-1.
25. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross V. Rapid detection of the hypertension associated Met235-Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Gen* 1993; 2: 609-10.
26. Holtz J. The cardiac renin-angiotensin system: physiological relevance and pharmacological modulation. *Clin Invest* 1993; 71: S25-S34.
27. Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Dal Palu C, Muiesan ML, Zanchetti A, on behalf of the RACE Study group. ACE inhibitor ramipril is more effective than β -blocker atenolol in reducing left ventricular mass in hypertension. Results of RACE (Ramipril Cardioprotective Evaluation) study. *J Hypertens* 1995; 13: 1325-34.
28. Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *JAMA* 1996; 275: 1507-13.
29. Dahlöf B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1992; 5: 95-110.
30. Devereux RB, Alderman MH. Role of preclinical cardiovascular disease in the evolution from risk factor exposure to development of morbid events. *Circulation* 1993; 88[part 1]: 1444-5.
31. Linhart A, Vondráček V, Horký K, Peleška J, Bultas J. Left ventricular morphology and function in normotensive men with a positive family history of arterial hypertension. *Cor Vasa* 1994; 36: 219-23.
32. Galderisi M, Celentano A, Tammaro P, *et al.* Ambulatory blood pressure monitoring in offspring of hypertensive parents. Relation to left ventricular structure and function. *Am J Hypertens* 1993; 6: 114-20.
33. Calentano A, Galderisi M, Garofalo M, *et al.* Blood pressure and cardiac morphology in young children of hypertensive subjects. *J Hypertens* 1988; (Suppl 4): S107-S109.
34. Takami S, Katsuya T, Rakugi H, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 316-21.
35. Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, *et al.* Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 1996; 334: 1023-8.
36. Hamon M, Amant C, Bauters C, *et al.* Association of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes with left ventricular function and mass in patients with angiographically normal coronary arteries. *Heart* 1997; 77: 502-5.
37. Pontremoli R, Sofia A, Tirota A, *et al.* The deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2550-8.
38. Perticone F, Ceravolo R, Cosco C, *et al.* Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy in southern Italian patients. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 365-9.
39. Celentano A, Mancini F, Crivaro M, *et al.* Cardiovascular risk factors, angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism, and left ventricular mass in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1196-200.
40. Gharavi AG, Lipkowitz ML, Diamond JA, Chamie R, Phillips RA. Ambulatory blood pressure monitoring for detecting the relation between angiotensinogen gene polymorphism and hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10: 6, 687-91.
41. Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, *et al.* Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *J Hypertens* 1998; 16: 37-44.
42. Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ. Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 1996; 28: 907-11.
43. Dudley C, Keavney B, Casadei B, Conway J, Bird R, Ratcliffe P. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. *J Hypertens* 1996; 14: 259-62.
44. Brand E, Chatelain N, Keavney B, *et al.* Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension* 1998; 31: 725-9.
45. Bigda J, Narkiewicz K, Chrostowska M, *et al.* No effect of genetic variation at the angiotensinogen locus on ambulatory blood pressure level in normotensive subjects. *Am J Hypertens* 1997; 10: 692-5.
46. Mondorf UF, Russ A, Wiesemann A, Herrero M, Oremek G, Lenz T. Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 174-83.
47. Karjalainen J, Kujala UM, Stolt A, *et al.* Angiotensinogen gene M235T polymorphism predicts left ventricular hypertrophy in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 494-9.

Submitted October 1, 1999; accepted December 7, 1999

Address for correspondence:

Aleš Linhart, MD, PhD
2nd Dept. of Internal Medicine
1st School of Medicine, Charles University
U nemocnice 2
CZ-128 08 Prague 2
Czech Republic
Tel: + 42 02 24 96 26 35
Fax: + 42 02 29 06 09

Hlubocká Z, Umnerová V, **Heller S**, Peleška J, Jindra A,
Jáchymová M, Kvasnička J, Horký K, Aschermann M.

**Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1
and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction
in uncomplicated essential hypertension: the effect of
treatment with ACE inhibitors.**

J Hum Hypertens 2002;16(8):557-62

ORIGINAL ARTICLE

Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors

Z Hlubocká¹, V Umnerová¹, S Heller¹, J Peleška¹, A Jindra¹, M Jáchymová¹, J Kvasnička², K Horký¹ and M Aschermann¹

¹Second Department of Internal and Cardiovascular Medicine, First School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; ²Department of Clinical Hematology, First School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

The aim of the study was to examine whether the circulating cell adhesion molecules, von Willebrand factor (vWf) and endothelin-1, are elevated in patients with essential hypertension with no other risk factors for atherosclerosis and thus may serve as markers of endothelial dysfunction in uncomplicated hypertension. Furthermore, the effect of treatment with the ACE inhibitor, quinapril, on levels of endothelial dysfunction markers were studied. The levels of adhesion molecules (intercellular cell adhesion molecule-1 [ICAM-1], E-selectin, P-selectin), von Willebrand factor (vWf) and endothelin-1 were measured in patients with hypertension without any other risk factors of atherosclerosis before and after treatment with quinapril ($n = 22$) and in normotensive controls ($n = 22$). Compared with normotensive subjects, the hypertensive patients had significantly higher levels of ICAM-1 (238 vs 208 ng/ml, $P = 0.02$), vWf (119 vs 105 IU/dl, $P < 0.05$) and endothelin-1 (5.76 vs 5.14 fmol/ml, $P < 0.05$). Three-month treatment of hyper-

tensive patients with quinapril led to a significant decrease in the levels of endothelin-1 (5.76 vs 5.28 fmol/ml, $P < 0.01$). We did not observe significant changes in the levels of adhesion molecules and vWf after ACE inhibitor treatment, although a trend toward a decrease was apparent with all these parameters. Patients with uncomplicated hypertension with no other risk factors of atherosclerosis had significantly elevated levels of ICAM-1, vWf, and endothelin-1. Our data suggest that these factors may serve as markers of endothelial damage even in uncomplicated hypertension. In hypertensive patients, treatment with the ACE inhibitor quinapril resulted in a significant decrease in endothelin-1 levels. These findings indicate a beneficial effect of ACE inhibitors on endothelial dysfunction in hypertensive patients.

Journal of Human Hypertension (2002) 16, 557–562.
doi:10.1038/sj.jhh.1001403

Keywords: soluble adhesion molecules; von Willebrand factor; endothelin-1; endothelial dysfunction

Introduction

Hypertension is one of the main risk factors for cardiovascular diseases and accelerated development of atherosclerosis and its complications. The first

step in the development of atherosclerosis is impairment of the physiological function of vascular endothelium referred to as endothelial dysfunction. Cell adhesion molecules play an important role in this initial phase of development of atherosclerosis.

Endothelial dysfunction in hypertensive individuals is characterised by impaired vasorelaxation mediated by endothelium (in the presence of a decreased activity of vasodilators, endothelium-derived relaxant factor/nitric oxide (EDRF/NO) in particular, and an increased activity of vasoconstrictor factors as endothelin), increased adhesion and

Correspondence: Z Hlubocká, MD, Second Department of Internal and Cardiovascular Medicine, First School of Medicine, Charles University, U nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic.
E-mail: zmare@hotmail.com
Received 12 July 2001; revised 3 February 2002; accepted 7 February 2002

permeability of endothelial cells and structural changes of the vascular wall.

Endothelial dysfunction has been associated with increased expression of glycoprotein adhesion molecules of the selectin group¹ (E-selectin and P-selectin) and immunoglobulin group (intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). These surface molecules allow leukocytes to adhere to the endothelial surface and subsequently to migrate into the vessel wall. Subendothelial accumulation of inflammatory cells with subsequent formation of foam cells is the first step in the development of atherosclerosis.² Increased expression of cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin has been observed in human atherosclerotic plaques.^{3,4}

Furthermore, the amount of soluble ICAM-1 and E-selectin released into the circulation has been demonstrated to directly correlate with the surface expression of ICAM-1 and E-selectin in a culture of endothelial cells.⁵ Upregulation of adhesion molecule genes leads to the expression of membrane-associated adhesion molecules and release of their soluble forms. Based on these findings, we assume that circulating soluble adhesion molecules levels may act as markers of adhesion molecules expression *in vivo*.^{6,7}

Increased plasma levels of E-selectin have been demonstrated in conditions associated with an increased risk for the development of atherosclerosis, eg, in type-2 diabetes mellitus⁸ and in essential hypertension.⁹ Patients with hypertension associated with other risk factors for atherosclerosis have been shown to exhibit elevated plasma levels of soluble ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and von Willebrand factor (vWf).^{10,11} Elevated levels of soluble P-selectin were associated with increased risk of future myocardial infarction and cardiovascular death in apparently healthy women.¹² Increased plasma levels of P-selectin were also reported in patients with renovascular and malignant hypertension while the authors did not observe statistically significant changes in P-selectin levels in patients with primary hypertension.¹³

The pathogenesis of arterial hypertension and its complications includes both mechanical factors (increase in blood pressure (BP), increased peripheral vascular resistance, and shear stress), and hormonal factors (renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system, catecholamines, etc). Increased activity of the renin-angiotensin system is an important factor in the pathogenesis of arterial hypertension. Recently, it has been shown that intravenous angiotensin II infusion (at an initial dose of 1 ng/kg/min, increased each 30 min by 2 ng/kg/min to the final dose of 7 ng/kg/min) increases plasma ICAM-1 concentrations in healthy volunteers and subjects with essential hypertension,¹⁴ thereby enhancing leukocyte adhesion and migration to the vascular wall. Selective blockade of the AT-1 receptor for angiotensin II then resulted in a decrease in serum ICAM-1

levels.¹⁴ By contrast, a previous study described only slight, statistically non-significant increments (11%) of soluble ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 levels in healthy volunteers during graded 4-h infusion of angiotensin II at doses up to 20 ng/kg/min (average dose 8 ng/kg/min).¹⁵ The reason for this discrepancy is unclear.

Apart from the decrease in BP, one of the aims of antihypertensive therapy is the reversal of endothelial dysfunction. The studies described above indicate that angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, through their comprehensive action on the RAA system may improve impaired endothelial function in hypertensive subjects; one of the mechanisms of action of ACE inhibitors seems to be downregulation of cell adhesion molecules.

The present study focuses on whether plasma levels of adhesion molecules, vWf and endothelin-1 may serve as markers of endothelial dysfunction in hypertensive patients who have no other risk factor of atherosclerosis.

Aims of the study

Increased levels of soluble adhesion molecules have been reported in a number of studies in patients with overt atherosclerosis or with accumulation of risk factors of atherosclerosis^{8–11} and are thought to be markers of endothelial dysfunction in the early stages of atherosclerosis.

The aim of our study was to establish whether patients with uncomplicated essential hypertension with no other risk factors of atherosclerosis have increased levels of soluble adhesion molecules (E-selectin, P-selectin, and ICAM-1) and other potential markers of endothelial dysfunction (vWF, endothelin-1). A secondary aim was to assess the effect of antihypertensive therapy with the ACE inhibitor, quinapril, on levels of adhesion molecules and other endothelial dysfunction markers.

Subjects and methods

Subjects

In the period from March 1999 through January 2001 we examined at the Second Department of Internal and Cardiovascular Medicine, General University Hospital in Prague, Czech Republic, a total of 22 middle-aged men (35–66 years, mean age 50 ± 10 years) with mild essential hypertension (mean systolic BP 143 ± 18 mm Hg, mean diastolic BP 94 ± 8 mm Hg) with no other risk factors of atherosclerosis. They were either newly diagnosed patients, without any treatment, or hypertensive individuals examined after a 3-week discontinuation of antihypertensive therapy. A control group comprised 22 healthy age-matched men (34–65 years, mean age 46 ± 7 years) with normal BP values (BP below 140/90 mm Hg, mean systolic BP 122 ± 11 mm Hg, diastolic BP 83 ± 6 mm Hg), without any risk factors of athero-

sclerosis. The characteristics of the two groups are shown in Table 1. Exclusion criteria included diabetes mellitus, marked hypercholesterolaemia, smoking, clinically overt form of atherosclerosis (coronary artery disease, stroke, peripheral vascular disease or carotid atherosclerosis), increased serum creatinine levels, and abnormal resting ECG. The patients had no serious concomitant disease, allergies, or recent acute infectious or inflammatory disease. The study was approved by the hospital's ethics committee and patients signed informed consent with their participation.

Methods

Baseline clinical assessment: BP values were measured using the current Guidelines for the Management of Hypertension by the WHO-ISH. The diagnosis of arterial hypertension was either established in patients by repeated BP measurements (three times) on two different visits, or the patients had been diagnosed to have hypertension previously and were already receiving treatment ($n = 10$), in which case they were examined after a 3-week discontinuation of therapy. Previous antihypertensive therapy included beta-blockers in six patients, calcium antagonists in two patients and a combination of beta-blockers and diuretics in two patients.

All subjects underwent a thorough physical examination, ECG, basic laboratory tests, and had a blood sample collected for the determination of markers of endothelial dysfunction. In patients with arterial hypertension, the examination was repeated after 3-month treatment with the ACE inhibitor quinapril at a dose of 5–40 mg daily with the mean dose of 13.2 ± 8.3 mg, depending on the BP levels. After 3 months of treatment with quinapril we observed a statistically significant decrease in BP—mean systolic BP decreased with ACE inhibitor therapy from 143 ± 15 mm Hg to 137 ± 15 mm Hg ($P < 0.05$) and mean diastolic BP from 94 ± 8 mm Hg to 88 ± 9 mm Hg ($P < 0.01$).

Laboratory methods: A venous blood sample was drawn in the morning (after an overnight fast) fol-

lowing a 20-min bedrest in the supine position. Blood samples were analysed using standard laboratory methods to determine basic laboratory parameters (ESR, electrolytes, creatinine, urea, lipoprotein spectrum, haemocoagulation parameters, CRP). The levels of soluble adhesion molecules E-selectin, P-selectin, and ICAM-1 were determined using commercial monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Abingdon, UK). The monoclonal antibodies used were specific for E-selectin, P-selectin and ICAM-1. Von Willebrand factor levels were measured in plasma by commercial ELISA kit using specific rabbit anti-human vWf antibodies (Asserachrom, Diagnostica Stago, France). Plasma levels of endothelin-1 were determined using radioimmunoassay commercial kit (DRG-Instruments GmbH, Marburg, Germany).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using JMP 3.2.2 statistical software. Comparisons between patients and healthy control subjects were performed by Student's *t*-test. Mann-Whitney U test was used to compare PAI values as data were nonnormally distributed. Changes in measured endpoints after quinapril therapy were compared with baseline values using paired *t*-test and Wilcoxon signed rank test for PAI values. All tests were two-sided. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Data are shown as means \pm standard deviation (sd) and as median and interquartile range for PAI values.

Results

We did not find significant differences between hypertensives and controls in terms of age, body mass index, total cholesterol and glucose levels. Compared with controls, hypertensive patients had significantly higher systolic and diastolic BP values (Table 1).

Patients with uncomplicated essential hypertension had significantly higher levels of sICAM-1, vWf, and endothelin-1 as compared with controls (Figure 1). The groups did not differ significantly in the levels of E-selectin, P-selectin, fibrinogen, t-PA, and PAI. Values of the soluble adhesion molecules sICAM-1, sE-selectin, and P-selectin, vWF, other haemocoagulation parameters (fibrinogen, t-PA, PAI), endothelin-1 and nitric oxide are summarised in Table 2.

Three-month treatment with the ACE inhibitor quinapril led to a significant decrease in the levels of endothelin-1 ($P = 0.01$) (see also Table 2).

ICAM-1 levels showed, during treatment, a statistically non-significant trend toward a decrease (11 ng/mL decrease, 95%CI (−1.2, 21.6)). No significant changes in the levels of adhesion molecules E-selectin (2.9 ng/mL decrease; 95%CI (−1.2; 7.2)) and P-selectin (2 ng/mL decrease; 95%CI (−12.5; 15.9)),

Table 1 Subjects characteristics (data are given as mean \pm s.d.)

	Controls ($n = 22$)	Hypertensives ($n = 22$)	Statistical significance <i>P</i>
Age (years)	46 ± 7	50 ± 10	$= 0.15$
Systolic BP (mm Hg)	128 ± 10	143 ± 18	< 0.001
Diastolic BP (mm Hg)	83 ± 8	94 ± 8	< 0.001
BMI (kg/m^2)	25.8 ± 2.6	27.4 ± 3.4	$= 0.12$
Total cholesterol (mmol/L)	5.51 ± 0.92	5.39 ± 0.91	$= 0.69$
Glucose (mmol/L)	5.46 ± 0.46	5.48 ± 0.65	$= 0.91$
Triglycerides (mmol/L)	1.40 ± 0.82	1.64 ± 0.69	$= 0.33$

P values < 0.05 were considered as statistically significant.

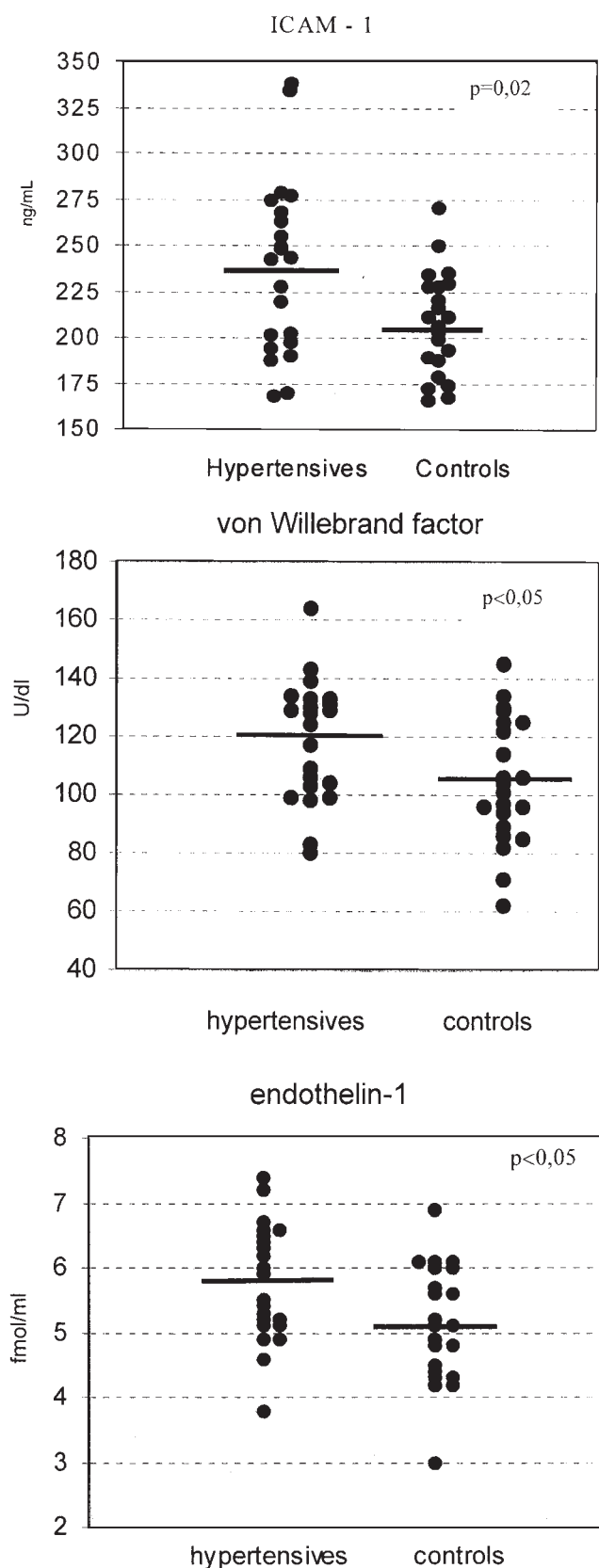


Figure 1 Comparison of the levels of ICAM-1, von Willebrand factor, and endothelin-1 in hypertensive subjects and controls.

Table 2 Plasma levels of cell adhesion molecules, von Willibrand factor, endothelin-1 and some haemocoagulation parameters in hypertensive patients and in controls before and after ACE inhibitor therapy

	Controls (n = 22)	Hypertensives (n = 22)	Hypertensives after therapy (n = 22)
vWf (U/dl)	105 ± 21.7	119 ± 20.8 $P_1 = 0.02$	116 ± 16.6 $P_2 = 0.24$
sICAM-1 (ng/mL)	208 ± 28.7	238 ± 49.7 $P_1 < 0.05$	227 ± 44.1 $P_2 = 0.11$
sE-selectin (ng/mL)	31.9 ± 11.3	34.9 ± 14.6 $P_1 = 0.47$	32.0 ± 13.1 $P_2 = 0.44$
P-selectin (ng/mL)	132 ± 34.6	136 ± 42.1 $P_1 = 0.75$	134 ± 38.8 $P_2 = 0.71$
endothelin-1 (fmol/ml)	5.14 ± 0.90	5.76 ± 0.90 $P_1 < 0.05$	5.28 ± 0.94 $P_2 < 0.01$
fibrinogen (g/L)	2.67 ± 0.57	2.83 ± 0.45 $P_1 = 0.33$	2.76 ± 0.41 $P_2 = 0.48$
t-PA (ng/ml)	3.96 ± 1.28	4.21 ± 1.30 $P_1 = 0.53$	3.98 ± 1.53 $P_2 = 0.42$
PAI (ng/ml)	68.7 (40.5, 99.5)	72.3 (62.4, 106) $P_1 = 0.14$	85.2 (61.2, 105) $P_2 = 0.80$

Data are expressed as means ± s.d., data for PAI values are expressed as median and interquartile range. P_1 values correspond with differences between hypertensive patients and controls, P_2 values with differences between hypertensive patients before and after ACEI therapy. P values <0.05 were considered as statistically significant.

vWf and haemocoagulation parameters were seen during quinapril therapy (Table 2). The power calculation for observed changes in adhesion molecules and vWf was 50–55%.

After quinapril therapy, the elevated levels of soluble ICAM-1, vWf and endothelin-1 in the hypertensive group decreased and no longer differed significantly from those of the control group.

Discussion

To our knowledge, all studies conducted to-date, demonstrating increases in the levels of soluble adhesion molecules and vWf included groups of patients with severe hypertension, overt atherosclerosis, other metabolic abnormalities or with a variety of risk factors of atherosclerosis. Our study was therefore designed to assess the effect of haemodynamic and humoral changes on impairing physiological endothelial function in patients with uncomplicated hypertension. No other conventional risk factors leading to endothelial dysfunction were present in our groups of hypertensive patients and healthy age- and sex-matched controls. Patients with mild arterial hypertension, free of other risk factors of atherosclerosis, were shown to have elevated serum levels of soluble adhesion molecule ICAM-1, endothelin-1 and vWf compared to controls. We thus believe the increased levels of ICAM-1, endothelin-1 and vWf directly reflect endothelial activation in the presence of an elevated blood pressure in the early stages of hypertension.

The exact mechanism by which arterial hypertension leads to the increase in levels of cell adhesion molecules and other endothelial factors is not fully understood. An important role is played by haemodynamic changes (increase in stroke volume and peripheral vascular resistance) as well as humoral changes affecting endothelial function. Some authors suggest a relationship between the increased activity of the renin-angiotensin system and development of atherosclerosis. Pastore *et al*¹⁴ demonstrated increased expression and plasma levels of cell adhesion molecule ICAM-1 with intravenous angiotensin II infusion. Furthermore, angiotensin II have been shown to stimulate production of endothelin-1¹⁶ and plasminogen-activator inhibitor-1¹⁷ *in vivo*. Increased ICAM-1 levels have recently been reported in patients with coronary artery disease and were regarded as an independent risk factor of myocardial infarction in patients with coronary artery disease¹⁸ and in healthy males.¹⁹

Our finding of increased vWf levels in patients with uncomplicated mild essential hypertension extends the results of previous studies demonstrating elevated vWf levels in hypertensives with other risk factors of atherosclerosis¹¹ and in patients with overt atherosclerosis²⁰ even to the early stages of hypertension.

Unlike some other authors^{9,11} we did not observe increased levels of E-selectin in our group of hypertensive subjects. All previous studies were conducted on groups of patients with severe hypertension, other risk factors of atherosclerosis (smoking, hyperlipidaemia, impaired glucose tolerance etc) or overt atherosclerosis. The increased levels of E-selectin thus may have reflected the effect of other risk factors damaging the endothelium. In our view, the different results reflect the different characteristics of groups of patients and controls.

We have also demonstrated significantly elevated plasma levels of endothelin-1 in hypertensive patients. This is consistent with data that emerged recently from studies performed on patients with essential hypertension without signs of damage to target organs²¹ or on patients of African descent.²² Given its marked vasoconstrictor, mitogenic, and inotropic properties, endothelin-1 might play a key role in the pathogenesis of increased peripheral vascular resistance and endothelial dysfunction in hypertensive individuals.

Three-month treatment of mild arterial hypertension with the ACE inhibitor quinapril resulted in a significant decrease in endothelin-1 levels. The decrease in the plasma levels of the potent vasoconstrictor suggests a beneficial effect of ACE inhibitors on endothelial dysfunction in hypertensive patients and constitutes just another effect of the comprehensive action of ACE inhibitors.

By contrast, the levels of adhesion molecules and vWf were not significantly affected by quinapril; however, there was an apparent trend towards a decrease in all these parameters, and in ICAM-1 in

particular. The plasma levels of all of the target parameters did not differ significantly between hypertensive patients after ACE inhibitor treatment and the control group of healthy individuals. Failure to demonstrate significant decrease of E-selectin and ICAM-1 levels with ACE inhibitor therapy is in agreement with a previous study performed by Gasic *et al*²³ in borderline hypertensive patients with diabetes. On the contrary, Ferri *et al*⁷ observed a significant 30–80% decrease of E-selectin and ICAM-1 levels in hypertensive patients treated with ACE inhibitors. The effect of ACE inhibitor therapy directly correlated with the dose of enalapril. Compared with our study Ferri *et al*⁷ examined patients with more severe hypertension and the majority of patients also had other metabolic abnormalities. Thus the discrepancy between our results and data presented by Ferri *et al*⁷ may reflect different groups of patients and a different type and dose of ACE inhibitor used. However the small number of patients limits the power of our study with regard to detecting changes in adhesion molecules with therapy. Thus we cannot exclude that failure to demonstrate a decrease in soluble adhesion molecules with therapy may be due to small numbers.

Conclusion

Patients with uncomplicated essential hypertension without other risk factors of atherosclerosis have been shown to have elevated plasma levels of intercellular cell adhesion molecule-1, vWf, and endothelin-1. Increased levels of ICAM-1, vWf, and endothelin-1 act as markers of endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension. Treatment of hypertensive patients with the ACE inhibitor quinapril resulted in a significant decrease in elevated plasma levels of endothelin-1. ACE inhibitor therapy helps to normalise impaired endothelial functions in hypertensive subjects.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Internal Grant Agency, Ministry of Health of the Czech Republic No. NA/5615–3 and 64 165.

References

- 1 Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; **91**: 379–387.
- 2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; **362**: 801–809.
- 3 Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; **171**: 223–229.
- 4 O'Brien KD *et al*. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. *Circulation* 1996; **93**: 672–682.

- 5 Leeuwenberg JFM *et al*. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992; **77**: 543–549.
- 6 Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; **14**: 506–512.
- 7 Ferri C *et al*. Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension* 1999; **34**: 568–573.
- 8 Fasching P, Waldhäusl W, Wagner OF. Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM: potential mediators in diabetic macroangiopathy. *Diabetologia* 1996; **39**: 1242–1244.
- 9 Blann AD, Tse W, Maxwell SJR, Waite MA. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens* 1994; **12**: 925–928.
- 10 Ferri C *et al*. Early activation of vascular endothelium in non-obese, non-diabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities. *Diabetes* 1998; **47**: 660–667.
- 11 Blann AD, Waite MA. von Willebrand factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in predicting the progression of atherosclerosis. *Coronary Artery Dis* 1996; **7**: 143–147.
- 12 Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001; **103**: 491–495.
- 13 Verhaar MC *et al*. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating P-selectin. *J Hypertens* 1998; **16**: 45–50.
- 14 Pastore L *et al*. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999; **100**: 1646–1652.
- 15 Krejcy K *et al*. Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leucocyte count in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; **74**: 9–14.
- 16 Dohi Y *et al*. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance artery. *Hypertension* 1992; **19**: 131–137.
- 17 Ridker PM *et al*. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II: evidence of a potential interaction between the renin angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 1993; **87**: 1968–1973.
- 18 Wallén NH, Held C, Rehnqvist N, Hjemdahl P. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999; **20**: 1039–1043.
- 19 Ridker PM *et al*. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; **351**: 88–92.
- 20 Fowkes FGR *et al*. Cross-linked fibrin degradation products, progression of peripheral arterial disease and risk of coronary heart disease. *Lancet* 1993; **342**: 84–86.
- 21 Schneider MP *et al*. Plasma endothelin is increased in early essential hypertension. *Am J Hypertens* 2000; **13**: 579–585.
- 22 Ergul A. Hypertension in black patients: an emerging role of endothelin system in salt sensitive hypertension. *Hypertension* 2000; **36**: 62–67.
- 23 Gasic S *et al*. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. *Am J Hypertens* 1999; **12**: 217–222.